УДК: 612.419+612.83:611-08

ЗМІНИ МОРФОЛОГІЇ ТА БІОХІМІЇ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ ПІД ВПЛИВОМ КСЕНОГЕННОЇ СПИННОМОЗКОВОЇ РІДИНИ

В.С. ПИКАЛЮК, доктор медичних наук
Л.Р. ШАЙМАРДАНОВА, кандидат медичних наук
О.С.РУДИК, студент
ДУ «Кримський державний медичний університет ім. С.І.Георгієвського»

Проведено доклінічні дослідження з вивчення властивостей ксеногенної спинномозкової рідини (КСМР) як субстрата для можливого створення лікарського засобу.

У клітинах кісткового мозку за допомогою ШИК-реакції виявили накопичення глікогену, що є характерною ознакою повноцінної диференціації клітин. Отже, КСМР можливо використовувати при порушеннях дозрівання клітин-попередників.

Спинномозкова рідина, кістковий мозок, дослідження.

Багато світових дослідницьких лабораторій сконцентрували зусилля на пошук нових біопептидних регуляторів поліфункціональної дії. Як один з таких субстратів досліджується спинномозкова рідина (СМР), яка є цінним біологічним середовищем нервової системи і має унікальні імунобіологічні властивості [2]. Насамперед, вивчався склад та біологічні властивості алогенної СМР, інфузії якої доводили її високу ефективність при корекції різноманітних патологічних станів; у подальшому стали використовувати ксеногенну СМР [7]. В експериментах була доведена відсутність тератогенних, ембріотоксичних властивостей ксеногенної спинномозкової рідини (КСМР), а також імунопатологічних реакцій після її введення [4, 5, 6]. Доклінічні дослідження з вивчення властивостей КСМР, яка розглядається як можлива сировина для виготовлення нового імунобіологічного препарату, проводяться *in vivo* у Кримському державному медичному університеті ім. С.І. Георгієвського на базі кафедри нормальної анатомії людини [1, 3].

Мета дослідження – вивчення морфофункціональних змін кісткового мозку, як центрального органа гемопоезу та імуногенезу під впливом КСМР.

Матеріал і методи дослідження. КСМР отримували за авторським методом, проводили через бактеріальні фільтри «Міліпор» та запаювали в ампули. Для експерименту були відібрані білі щури лінії Вістар обох статей 4 вікових категорій: новонароджені (I), нестатевозрілі (інфантильні, II), статевозрілі (молодий репродуктивний вік, III), тварини похилого віку

© В.С. Пикалюк, Л.Р. Шаймарданова, О.С.Рудик, 2013

(IV). КСМР вводили 1-, 3- і 10-разово з інтервалом у два дні. Матеріал для дослідження – кістковий мозок забирали на 7- та 30-ту доби. Зміни клітин кісткового мозку порівнювали за відбитками і мазками кісткового мозку стегнових кісток експериментальних щурів того ж віку, статі, маси. Для дослідження морфології клітин використовували забарвлення за Романовським–Гімза, для цитохімічного дослідження – реакції PAS (Periodic Acid Shiff reaction) за McManus і Hotchkiss, та МПО (реакція на мієлопероксидазу) за Loele. Результати подано як середній цитохімічний коефіцієнт (СЦК), використовуючи напівкількісний метод за Astaldi, Verga.

Результати дослідження. В експерименті, під впливом КСМР у тварин І групи як на 7-, так і на 30-ту добу у картині мазка кісткового мозку (КМ) не було виявлено патологічних проявів – змін форми клітин та їх ядер, незвичайних включень у цитоплазмі. КМ містив представників усіх клітинних ліній різних класів диференціації, розподілених за ступенем зрілості. При забарвленні PAS-реакцією фіксували дифузне забарвлення цитоплазми мієлобластів та промієлоцитів. Нейтрофільні мієлоцити та метамієлоцити містили помірну кількість глікозаміногліканів, але менше ніж поліморфноядерні клітини. В еозинофільних метамієлоцитах і мієлоцитах PAS-позитивний матеріал цілковито заповнював цитоплазму, залишаючи незабарвленими великі специфічні еозинофільні гранули. Така ж картина спостерігалась у зрілих еозинофілах. Поліморфноядерні нейтрофільні лейкоцити містили дуже багато PAS-позитивного матеріалу у вигляді доволі дрібних гранул, які щільно заповнювали цитоплазму. Гранули розташовувалися і над поверхнею ядра. Специфічні гранули базофілів виявлялися PAS-негативними, однак у деяких реакція була слабкопозитивною завдяки глікозаміногліканам та фосфоліпідам. У цитоплазмі лімфоцитів часто фіксували PAS-позитивні гранули, розкидані по клітині. Частина лімфоцитів містила PAS-позитивний матеріал у вигляді вінця із гранул навколо ядра, в інших лімфоцитах він містився у вигляді крупних блоків. Моноцити містили невелику кількість дрібних розсіяних гранул глікогену. У цитоплазмі мегакаріоцитів на дифузно забарвленому тлі фіксувались інтенсивно позитивні гранули. Периферія цитоплазми частіше була незабарвленою, мала облямівку із гранул у місцях відшнурування PAS-позитивних тромбоцитів. У І групі тварин на 7 добу середній цитохімічний коефіцієнт (СЦК) PAS-реакції клітин кісткового мозку становив 1,3$\pm$0,01 у контрольній групі та 1,38$\pm$0,03* в експериментальній (* – тут і далі,*P<0,05). Подібне підвищення СЦК спостерігалося на 30-ту добу в тій же групі – з 1,27$\pm$0,01 у контролі до 1,61$\pm$0,03* в експериментальній. В цій групі тварин активність мієлопероксидази (МПО) виявлялась 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 МПО, а у зрілих базофілах реакція була негативна. У моноцитах визначалися розсіяні слабкопозитивні гранули. Реакція МПО була абсолютно негативною в еритроїдних клітинах, мегакаріоцитах та

лімфоцитах. СЦК реакції МПО у І групі піддослідних тварин на 7-му добу становив 1,41±0,06*, лишаючись позаду відповідного значення в контрольній групі (1,58±0,01). На 30-ту добу СЦК МПО у цій групі становив 1,41±0,06*, що відображало зниження активності МПО порівняно з контрольною групою, де СЦК становив 1,73±0,08.

У тварин ІІ групи після 3- і 10-разового введення КСМР на 7- та 30-ту добу спостереження структура клітин не вирізнялася від контрольної групи. КМ дослідних тварин містив клітини усіх гемопоетичних ліній без ознак атипізму. При забарвленні реакцією PAS, глікозаміноглікани визначалися в усіх морфологічно ідентифікованих клітинах гранулоцитарного ряду. Концентрація PAS-позитивного матеріалу в клітинах гранулоцитопоезу наростала по мірі дозрівання клітин. Дифузне забарвлення цитоплазми фіксували у наймолодших клітинах гранулоцитарного ряду (мієлобласти, промієлоцити, мієлоцити). У зрілих нейтрофілах містилося багато PAS-позитивної речовини у вигляді дрібних, щільно упакованих гранул, за якими важно було розрізнити цитоплазматичний фон. У зрілих еозинофілах та базофілах специфічні гранули залишалися незабарвленими і різко виділялися на тлі дифузного забарвлення цитоплазми. В моноцитах PAS-позитивний матеріал частіше був представлений дрібною пилоподібною зернистістю. У лімфоцитах фіксували меншу концентрацію глікозаміногліканів ніж у гранулоцитах. У тварин ІІ групи триразове введення КСМР спричиняло вірогідне підвищення СЦК за PAS-реакцією з 1,26±0,01 у контрольній групі до 1,49±0,02* в експериментальній. Так само вірогідно збільшилося накопичення глікозаміногліканів після 10-разового введення КСМР тваринам тієї ж групи, де СЦК збільшився з 1,22±0,02 до 1,5±0,03*, у контрольній та дослідних групах відповідно. МПО виявляли у специфічних азурофільних гранулах у цитоплазмі гранулоцитів, починаючи з мієлобластів. У сегментоядерних нейтрофілах фіксували високу активність МПО у вигляді гранул, що заповнювали цитоплазму. Висока активність ферменту виявлялась у зрілих еозинофілах. У базофільних промієлоцитах та мієлоцитах активність МПО була порівняно високою. У зрілих базофілах МПО-матеріал не фіксувався. Слабкопозитивну реакцію на МПО спостерігали в деяких моноцитах у вигляді нечисленних розсіяних гранул. В еритрокаріоцитах, лімфоцитах і мегакаріоцитах МПО не виявлялась. Реакція МПО у ІІ дослідній групі свідчила про зростання активності ферменту по мірі дозрівання клітин. Кількість МПО-позитивного матеріалу та інтенсивність забарвлення значно збільшувались у дозріваючих клітинах нейтрофільних гранулоцитів порівняно з бластними. СЦК реакції МПО у ІІ групі тварин на 7-му добу становив 1,63±0,08, лишаючись позаду відповідного значення в контрольній групі (1,68±0,08). На 30-ту добу СКЦ МПО у цій групі становив 1,67±0,04*, що свідчило про зниження активності МПО порівняно з контрольною групою, де СЦК становив 1,68±0,01.

КМ тварин ІІІ групи внаслідок 3-разового введення КСМР виявив велику кількість мегакаріоцитів, видимих і на малому збільшенні. 10-

разове введення КСМР свідчило про збільшення кількості клітин різноманітних популяцій без зміни їх морфології. Так само, як і в інших групах, не було виявлено патологічних відхилень у структурі клітин. Токсигенна зернистість нейтрофілів відсутня, клітини ознак атипізму не мають. У тварин III групи внаслідок 3-разового введення КСМР спостерігали збільшення кількості глікозаміногліканів у клітинах КМ. СЦК за PAS-реакцією значно збільшився ніж у попередніх вікових групах – з 1,36±0,04 у контрольній групі до 1,56±0,05* в експериментальній. Після 10-разового введення КСМР на 30-ту добу СЦК збільшився з 1,37±0,05 у контрольній групі до 1,41±0,05* в експериментальній. Реакція МПО свідчила, що у III групі тварин внаслідок введення КСМР спостерігалося зменшення кількості мієлопероксидази у нейтрофільних гранулоцитах. СЦК реакції МПО у III групі тварин на 7-му добу становив 1,81±0,02*, лишаючись позаду відповідного значення у контрольній групі (1,84±0,01). На 30-ту добу СЦК МПО у цій групі становив 1,37±0,02*, що свідчило про зниження активності МПО порівняно із контрольною групою, де СЦК становив 1,84±0,01.

Структура клітин КМ дослідних тварин IV вікової групи не вирізнялася від групи контролю. Видимої патології у світловому мікроскопі, як і раніше, не спостерігали. Також не було виявлено ознак атипізму клітин, незвичайних включень у цитоплазмі, явної зміни клітинного складу у бік домінування одного із диферонів. Після 3-разового введення КСМР у IV групі тварин СЦК за PAS-реакцією дещо збільшувався – з 1,39±0,02 у контрольній групі до 1,49±0,01* в експериментальній. Внаслідок 10-разового введення у тій же групі спостерігали збільшення значення СЦК з 1,92±0,02 до 1,50±0,01* у контрольній та дослідній групах відповідно. СЦК реакції МПО у IV групі тварин на 7-му добу становив 1,64±0,02*, що свідчило про зниження активності МПО порівняно з контрольною групою, де СЦК становив 1,78±0,01.

Висновки

Видимих відмінностей у морфології клітин контрольної та дослідної груп у жодній серії експерименту не спостерігали. Забарвлення за Романовським–Гімза свідчило про відсутність видимих патологічних змін у клітинах IV–VII класів усіх диферонів. Цитохімічні реакції PAS та МПО виявили нормальний розвиток клітин-попередників. Завдяки PAS-реакції було виявлене вірогідне збільшення кількості PAS-позитивного матеріалу у дослідних групах порівняно із контрольними, що свідчить про вплив КСМР на глікогенакумулюючу функцію клітин, яка звичайно супроводжує процеси повноцінного визрівання клітин у КМ. Одночасно спостерігали вірогідне зменшення кількості продуктів пероксидазного окиснення (МПО-реакція) в усіх вікових групах, що опосередковано пов’язано із дією кортикотропного гормону у складі КСМР. Подальші дослідження будуть спрямовані на аналіз кількісних змін гемопоетичних клітин усіх диферонів за результатами мієлограми.

Список літератури

1. Ликвор как гуморальная среда организма / [Пикалюк В.С., Бессалова Е.Ю., Ткач В.В., и др.]. – Симферополь: ИТ «Ариал», 2010. – 192 с.

2. Макаров А.Ю. Роль ликвора в нейрогуморальной регуляции физиологических функций / А.Ю. Макаров // Успехи физиологических наук. – 1978. – Т. 9, № 4. – С.82–96.

3. 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.

4. Ткач В.В. 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. 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. – 1998. – Т. 134. – С. 89–95.

6. 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.

7. Фридман А.П. Основы ликворологии / Фридман А.П. – Л.: Медицина, 1971. – 647 с.

Проведены доклинические исследования по изучению свойств ксеногенной спинномозговой жидкости (КСМЖ) в качестве субстрата для возможного создания лекарственного препарата. В клетках костного мозга с помощью ШИК-реакции выявили накопление гликогена, что является характерным признаком полноценной дифференциации клеток. Следовательно, КСМЖ возможно использовать при нарушениях созревания клеток-предшественников.

Спинномозговая жидкость, костный мозг, исследования.

The investigations on the properties of the xenogenous cerebrospinal fluid (XCSF) as the base for the possible medicine are held on Human Anatomy Department in SE “Crimean State Medical University”. The PAS-reaction showed the glycogen accumulation in the bone marrow cells, that is the characteristic sign for cells differentiation. So, it is possible to use XCSF for progenitor cells in maturating failure.

Cerebrospinal fluid, bone marrow, investigations.