

DOI: 10.31393/reports-vnmedical-2019-23(1)-09

УДК: 616.7.018.46-092.9:616.632:615.356:577.161.3

ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОТЕКТИВНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ВІТАМІНУ Е ЩОДО КІСТКОВОГО МОЗКУ ЩУРІВ В УМОВАХ ПІДВИЩЕНОГО СПОЖИВАННЯ СОЛЕЙ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ

Линдіна Ю.М., Сікора В.В., Гирявенко Н.І., Линдін М.С., Романюк А.М.

Сумський державний університет, медичний інститут (вул. Римського-Корсакова, 2, м. Суми, Україна, 40000)

Відповідальний за листування:
e-mail: v.sikora@med.sumdu.edu.ua

Статтю отримано 3 грудня 2018 р.; прийнято до друку 3 січня 2019 р.

Анотація. При порушенні гомеостазу відбуваються зміни якісних та кількісних характеристик усіх паростків кровотворення. Це спонукає до пошуку ефективного протективного засобу в умовах забрудненого довкілля. Метою нашого дослідження стало вивчення протективних властивостей вітаміну Е щодо кісткового мозку щурів в умовах підвищеного споживання солей важких металів. Дослідження проведено при вивченні кісткового мозку у 36 лабораторних щурів-самців. Зрізи декальцинованих стегнових кісток забарвлювали гематоксиліном та еозином, за Ван-Гізеном та ШИК-реакцією, за допомогою імуногістохімічного дослідження рецепторів до CD3, CD79α, S100 та MPO. Елементний склад гемопоетичної тканини встановлено шляхом атомної спектрофотометрії. Накопичення важких металів у гемопоетичній тканині призводило до розвитку мікроелементозу (зміна якісних та кількісних показників усіх паростків гемопоєзу та оточуючих тканин). У міру пролонгації впливу екзогенних поллютантів відбувалися пригнічення еритроцито- та лейкоцитопоєзу, синхронне зростання кількості мегакаріоцитів. Ці параметри досягали значних рівнів відхилення на 90 добу спостереження. Використання вітаміну Е в якості коректора призводить до зменшення негативного впливу поллютантів, що проявляється меншим накопиченням важких металів у кістковому мозку, попередженням значних відхилень у кількісному та якісному складі кровотворної тканини.

Ключові слова: кістковий мозок, важкі метали, мікроелементоз, еритропоєз, гранулоцитопоєз, мегакаріоцит.

Вступ

У дорослих ссавців гемопоєз зазвичай відбувається у кістковому мозку (КМ), в якому у тісному взаємозв'язку знаходяться різні популяції клітин, що приймають участь у підтриманні, регулюванні та утворенні кінцевих стадій формених елементів крові (ФЕК) [9]. Однією з головних особливостей будови гемопоетичної тканини є те, що всі попередники розташовані близько з кровоносними судинами [4, 7]. Тому при порушенні гомеостазу відбуваються миттєві зміни якісних та кількісних характеристик всіх паростків кровотворення. На підставі дослідження, проведеного J. Mark Cline та Robert R. Maronpot, встановлено, що клітинний склад КМ у щурів змінюється, як з віком, так і з його локалізацією. Найбільш стабільна клітинність (частка гемопоетичних клітин) спостерігається у віці піддослідних 4-16 місяців [2].

У зв'язку з постійним розвитком промислового виробництва, посилення екзогенного впливу людини на довкілля, останнім часом особливої актуальності набули захворювання, які безпосередньо пов'язані зі зростанням кількості солей важких металів (СВМ) у навколишньому середовищі [3]. Хоча більшість з них є есенціальними для ссавців, при надлишковому їх надходженні до організму спостерігаються морфо-функціональні зміни у всіх органах, які при пролонгованому впливі призводять до декомпенсації захисних можливостей і розвитку незворотних порушень в організмі [8].

Усе вищезазначене спонукає до пошуку протективних препаратів, які б дозволили попередити розвиток деструктивних змін, як у КМ, так і в організмі в цілому.

Враховуючи патогенетичні особливості впливу СВМ на тканини (каталізують окислювальні реакції, активуючи перекисне окислення ліпідів (ПОК) та утворення активних форм кисню (АФК)), одним з таких перспективних засобів може бути вітамін Е.

Тому метою нашого дослідження стало вивчення протективних властивостей вітаміну Е на хімічні та морфологічні параметри кісткового мозку щурів в умовах підвищеного споживання солей важких металів.

Матеріали та методи

Особливості коливань елементного складу та кількісних і якісних характеристик КМ проведено на 36 лабораторних щурах-самцях, які перебували на стандартному раціоні харчування у приміщенні віварію медичного інституту СумДУ при температурі повітря 20-25°C, вологості - не більше 50%, світловому режимі день/ніч. Усі тварини були розподілені на 3 серії (по 12 у кожній): 1 - контрольну, 2 - щури, що вживали суміш СВМ ($ZnSO_4 \times 7H_2O$, $CuSO_4 \times 5H_2O$, $FeSO_4$, $MnSO_4 \times 5H_2O$, $Pb(NO_3)_2$ та $K_2Cr_2O_7$) у підвищених концентраціях, 3 - тварини, що поряд з вищезазначеними солями, отримували терапевтичну (враховуючи видову витривалість) дозу вітаміну Е. Щурів виводили з експерименту на 30 та 90 добу (по 6 тварин).

Вивчення особливостей будови КМ проводилося на декальцинованих стегнових кістках щурів, забарвлених гематоксиліном та еозином, за Ван-Гізеном та ШИК-реакцією. Різні паростки гемопоєзу були ідентифіковані

при імуногістохімічному дослідженні препаратів з виявленням рецепторів до CD3, CD79α, S100 та MPO. Елементний склад гемопоетичної тканини встановлено за допомогою атомної спектрофотометрії у лабораторії атомно-абсорбційного аналізу Центру морфологічних досліджень СумДУ.

Обробка даних проводилася прикладними статистичними методами за допомогою програми Microsoft Excel 2010 з додатком AtteStat 12.0.5. Оцінку вірогідності розбіжностей порівнюваних показників проводили з використанням t-критерію Ст'юдента (t). Взаємозв'язок між досліджуваними параметрами оцінювали згідно критерію кореляції Пірсона (r). Результати вважали статистично достовірними при ступеню вірогідності більше 95% ($p < 0,05$).

Робота виконана у рамках планової наукової теми кафедри патологічної анатомії №0113U003315 "Морфогенез загальнопатологічних процесів".

Результати. Обговорення

При вживанні СВМ у надфізіологічних концентраціях протягом 30 діб у тварин на рівні епіфізів площа, зайнята під еритроцитопоез, зменшилася на 27% ($p = 0,019$), площа лейкоцитопоезу зросла на 4% ($p = 0,22$), тромбоцитопоез зріс на 5,2% ($p = 0,77$). На рівні діафізу динаміка змін у КМ мала подібні закономірності. Площа еритроцитопоезу зменшилася на 15,9%, спостерігалось не-

значне зростання площі лейкоцитопоезу (на 3,6%) та зростання тромбоцитопоезу (5,2%), хоча ці показники були статистично недостовірними ($p > 0,05$). При хронічній інтоксикації СВМ (90 діб затравки) у щурів спостерігалось подальше наростання кількісних змін, хоча інтенсивність їх була менш вираженою. Так, площа еритроцитопоезу, знизилася на 36,6% ($p = 0,003$) на рівні епіфізів та на 19,7% ($p = 0,013$) на рівні діафізу; площа гранулоцитопоезу знизилася на 13% та 14,3% ($p < 0,001$) відповідно, тромбоцитопоез зріс на 40% ($p = 0,0015$).

Поступово зменшувалися розміри збережених еритропоетичних островців та кількість клітин у їх складі, серед яких виникали поодинокі попередники еритроцитопоезу з явищами дисеритроцитопоезу: ознаки каріорексису, неправильна форма ядер, між'ядерні містки та інші (рис. 1).

При дослідженні змін гранулоцитарного паростку гемоцитопоезу виявлено атипове розташування незрілих клітин (мієлобласти та промієлоцити) у центральній частині кістково-мозкових комірок епіфізів та поміж інших паростків гемоцитопоезу діафізу (у нормі вони розташовані паратрабекулярно та навколо синусоїдів). Поряд з цим серед предикторів виявлено ознаки порушення будови клітин: дисгранулярність цитоплазми, порушення сегментування ядер (гіперсегментованість), поліморфізм клітин (рис. 2).

В окремих випадках у КМ щурів на 90 добу експери-

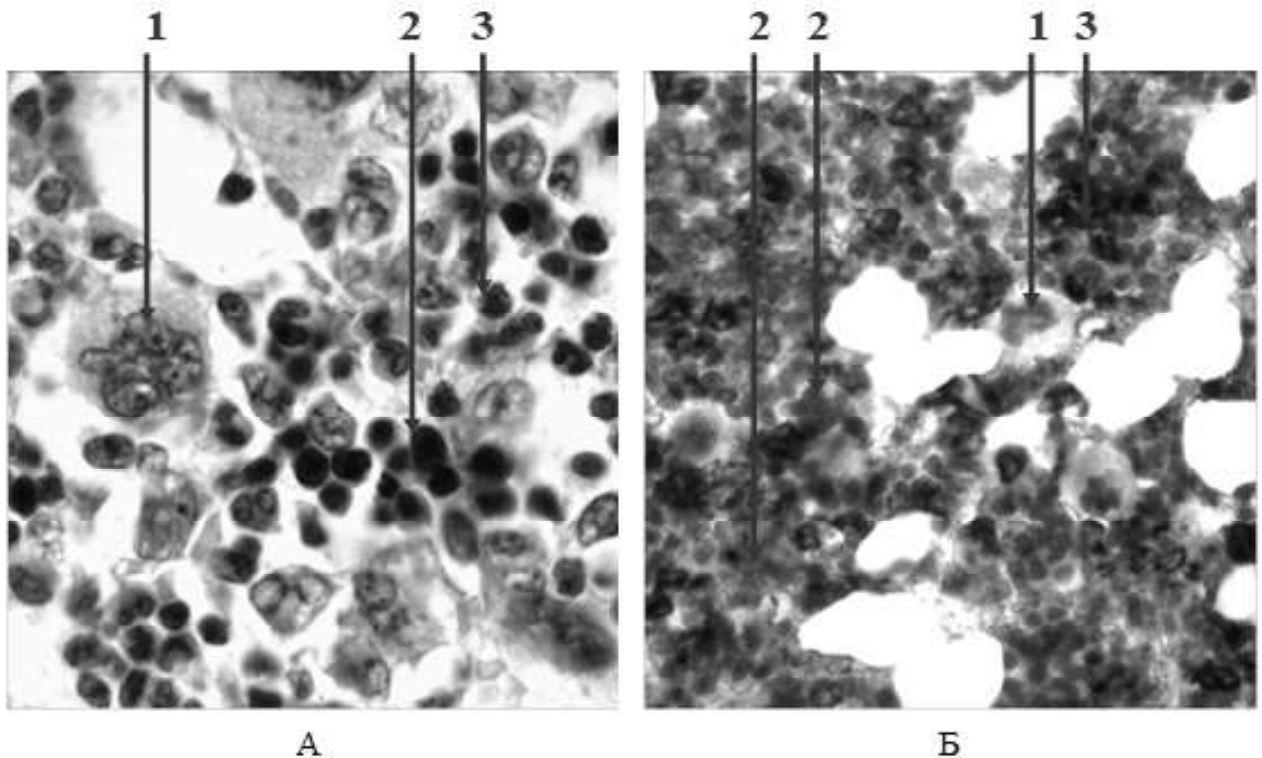


Рис. 1. Поздовжній зріз стегнової кістки щура 2-ї серії 1-ї групи. А - забарвлення гематоксиліном та еозином, збільшення $\times 1000$. Б - імуногістохімічне дослідження рецепторів до мієлопероксидази, збільшення $\times 400$.

Прийми: 1 - мегакаріоцит, 2 - еритроїдний острівцев, 3 - вогнища гранулоцитопоезу.

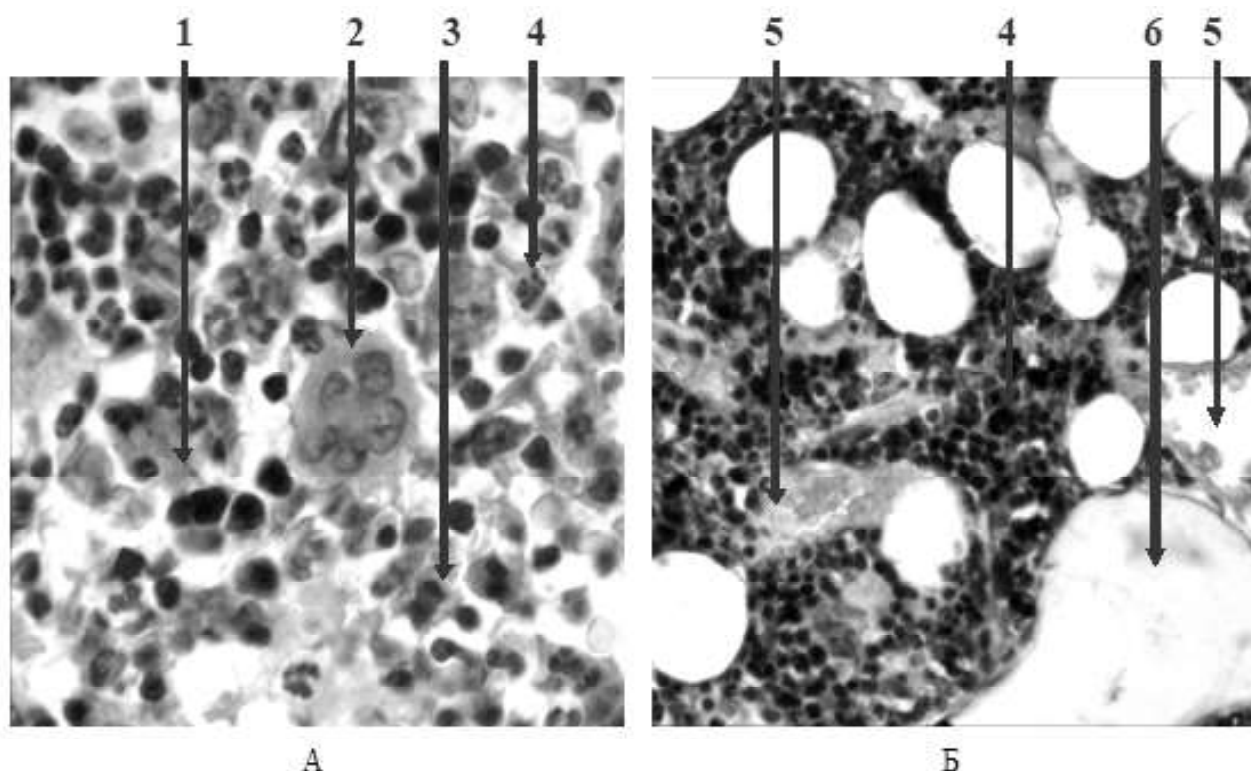


Рис. 2. Поздовжній зріз стегнової кістки щура 2-ої серії 1-ої групи. А - забарвлення гематоксиліном та еозином, збільшення $\times 1000$. Б - імуногістохімічне дослідження рецепторів до мієлопероксидази, збільшення $\times 400$.

Примітки: 1 - зрілі еритроцити, 2 - мегакаріоцит, 3 - еозинофільний гранулоцит, 4 - нейтрофільний гранулоцит, 5 - синусоїд, 6 - кісткова трабекула.

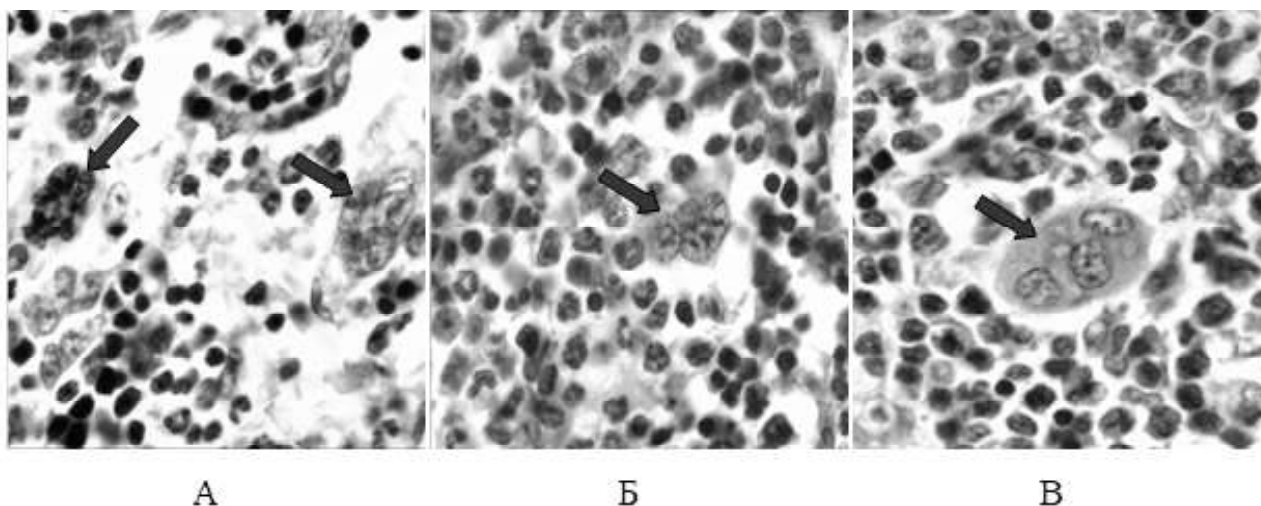


Рис. 3. Поздовжній зріз стегнової кістки щура 2-ої серії 1-ої групи. А - явища дисмегакаріоцитопоезу (гіперхроматоз), Б - мегакаріоцити зі спустошеною цитоплазмою, В - мегакаріоцити у вигляді багатоядерних клітин. Забарвлення гематоксиліном та еозином, збільшення $\times 400$.

менту виявлялися явища еозинофілії - різке зростання попередників та зрілих форм еозинофілів.

Вплив СВМ проявлявся і на якісних характеристиках мегакаріоцитів. Доволі часто спостерігалось скупчення попередників тромбоцитів у вигляді кластерів (рис. 3), іноді вони знаходились за умови відсутності контакту з синусоидами. Більш яскраво проявлялися значні відхи-

лення у формі та розмірах, як самих клітин, так і їх ядер (дисмегакаріоцитопоез): серед гемопоетичної тканини можна помітити, як "карликові", так і гігантські мегакаріоцити, зі значною кількістю цитоплазми (по відношенню до ядра) та з майже повною її відсутністю, їх ядра мали різноманітні форми, з формуванням клубків, численних відростків, полісегментування, гіперхроматоз.

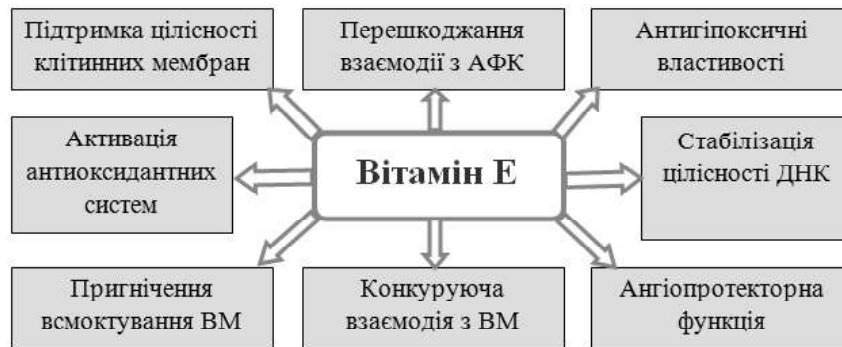


Рис. 4. Ефекти вітаміну Е, направлені на попередження негативного впливу надлишкового надходження ВМ у КМ.

Іноколи вони були схожі на багатоядерні клітини за рахунок наявності дуже тонких з'єднань між сегментами їх ядер.

Досліджуючи протективні властивості вітаміну Е, нами встановлено, що протягом експерименту із вживанням СВМ на фоні корекції порушень вітамінотерапією спостерігається подібна динаміка змін у гемопоетичній тканині, але вони мали менш виражений характер. Навіть через 3 місяці споживання СВМ у надлишкових концентраціях разом з вітаміном Е відбувалося зменшення еритроцитопоезу лише на 30% ($p=0,095$) на рівні епіфізів та на 17,8% ($p=0,019$) на рівні діафізів, площа лейкоцитопоезу зменшилась на 6,1% ($p=0,047$) та 13,7% ($p<0,001$) відповідно. Кількість мегакаріоцитів зросла на 25% ($p=0,035$).

На відміну від тварин другої серії першої групи, у щурів, яким проводили корекцію змін вітаміном Е, якісні порушення у КМ були виражені у меншій мірі, та більшість з них спостерігалася тільки через 3 місяці комбінованого впливу СВМ.

При порівнянні показників, отриманих при атомно-абсорбційній спектrophотометрії, з результатами гістологічного дослідження встановлено, що із зростанням кількості важких металів (ВМ) у тканині КМ статевозрілих щурів відбувалися (на рівні епіфізів та діафізу) пригнічення еритроцитопоезу ($r = -0,54$ та $r = -0,46$, $p<0,001$), гранулоцитопоезу ($r = -0,33$, $p=0,004$ та $r = -0,48$, $p<0,001$) та зростання площі тромбоцитопоезу ($r=0,4$, $p<0,001$). При чому найбільший вплив на варіабельність зазначених показників (при вивченні впливу кожного з досліджених елементів) мав хром (для гранулоцитопоезу $r = -0,57$, еритроцитопоезу - $r = -0,57$, тромбоцитопоезу - $r=0,47$, $p<0,001$), а найменший - цинк ($r = -0,44$, $p<0,001$, $r = -0,51$, $p<0,001$, $r=0,37$, $p=0,001$, відповідно). Інші метали також мали значний вплив на гемопоез, хоча їх кореляційні зв'язки мали менш виражений характер, у порівнянні із зазначеними ВМ.

Накопичення ВМ у гемопоетичній тканині знайшло пряме відображення на кровотворенні. У КМ спостерігався стрімкий розвиток мікроелементозу (зміна якісних та кількісних показників усіх паростків гемопоезу та оточуючих тканин). Нами виявлено, що у міру пролон-

гації впливу екзогенних поллютантів відбувалися пригнічення еритроцитопоезу, лейкоцитопоезу, синхронне зростання кількості мегакаріоцитів. Такі зміни мали тенденцію до наростання при пролонгації експерименту і досягали значних рівнів відхилення на 90 добу спостереження.

Як виявилось, найбільш чутливою складовою КМ є еритропоетична тканина, пригнічення якої досягає 36,6%. Також ми виявили певну особливість пригнічення кровотворення - зменшення кровотворної тканини більш

виражене у ділянці епіфізів, хоча у людей гематотоксичний ефект більш виражений у діафізі з тенденцією до поширення у напрямку епіфізів.

Поряд з кількісними змінами у КМ щурів виникали та, у міру пролонгації експерименту, наростали і якісні зміни - явища апоптозу та некрозу клітин, макрофагальна інфільтрація, міксоматоз, крововиливи, ектазія судин, набряк, ліпоматоз, диспластичні зміни в усіх паростках гемопоезу, порушення стратифікації розташування клітин еритроноу та попередників гранулоцитів, зміни архітеконики кісткових балок та інші.

Як виявилось, за умови використання коректора (вітаміну Е) у КМ зміни мають менш виражений характер. Так, у тварин, що протягом 90 діб споживали СВМ разом з терапевтичною дозою коректора (9,1 мг/кг), спостерігалось менш стрімке накопичення ВМ у гемопоетичній тканині, значно нижчі показники пригнічення кровотворення та якісні зміни серед усіх паростків кровотворення.

Використання вітаміну Е в якості коректора призводить до прямого конкуруючого ефекту з деякими ВМ - його окислювальне руйнування під впливом міді та заліза [1], змінює їх валентність, попереджаючи утворення АФК при їх надлишку [10], пригнічення всмоктування ВМ у шлунково-кишковому тракті [5]. За рахунок прямого контакту з еритроцитами, які допомагають транспортувати його по організму [6], реалізується прямий протективний ефект вітаміну Е на ФЕК (рис. 4).

Висновки та перспективи подальших розробок

1. За умов впливу важких металів відбувається пригнічення еритроцитопоезу та лейкоцитопоезу, синхронне зростання кількості мегакаріоцитів. Такі зміни мають тенденцію до наростання при пролонгації експерименту і досягають значних рівнів відхилення на 90 добу спостереження. На фоні мікроелементозу виникають та прогресують якісні зміни - явища апоптозу та некрозу клітин, макрофагальна інфільтрація, міксоматоз, крововиливи, ектазія судин, набряк, ліпоматоз, диспластичні зміни в усіх паростках гемопоезу та інші.

2. Використання вітаміну Е в якості коректора за

рахунок своїх антагоністичних властивостей з важкими металами призводить до зменшення негативного їх впливу, що проявляється меншим накопиченням важких металів у кістковому мозку, попередженням значних відхилень у кількісному та якісному складі крово-

творної тканини.

У подальшому планується вивчити реадaptaційні особливості кісткового мозку щурів за умов відміни впливу солей важких металів. Окремо стоїть питання дослідження коригувального впливу вітаміну Е на цей процес.

Список посилань - References

1. Brigelius-Flohe, R., & Traber, M. G. (1999). Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J.*, 13 (10), 1145-55. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10385606>.
2. Cline, J. M., & Maronpot, R. R. (1985). Variations in the histologic distribution of rat bone marrow cells with respect to age and anatomic site. *Toxicol. Pathol.*, 13 (4), 349-55.
3. Grazuleviciene, R., Nadisauskienė, R., Buinauskienė, J., & Grazulevicius, T. (2009). Effects of Elevated Levels of Manganese and Iron in Drinking Water on Birth Outcomes. *Polish J. of Environ Stud.*, 18 (5), 819-25.
4. Hirschi, K. K. (2012). Hemogenic endothelium during development and beyond. *Blood*, 119 (21), 4823-27. doi: 10.1182/blood-2011-12-353466.
5. Kim, E.-S., Noh, S. K., & Koo, S. I. (1998). Marginal zinc deficiency lowers the lymphatic absorption of alpha tocopherol in rats. *J. Nutr.*, 128, 265-70.
6. Niki, E., & Traber, M. G. (2012). A history of vitamin E. *Ann. Nutr. Metab.*, 61 (3), 207-12. doi: 10.1159/000343106.
7. Romaniuk, A., Lyndina, Yu., Sikora, V., Lyndin, M., Karpenko, L., & Gladchenko, O. (2016). Structural features of bone marrow. *Interv. Med. Appl. Sci.*, 8 (3), 121-6. doi: 10.1556/1646.8.2016.3.3.
8. Romaniuk, A., Sikora, V., Lyndin, M., Smiyanov, V., Sikora, V., Lyndina, Yu., ... Korobchanska, A. (2017). The features of morphological changes in the urinary bladder under combined effect of heavy metal salts. *Interv. Med. Appl. Sci.*, 9 (2), 105-11. DOI: 10.1556/1646.9.2017.2.09.
9. Tavian, M., & P?ault, B. (2005). Embryonic development of the human hematopoietic system. *Int. J. Dev. Biol.*, 49 (2-3), 243-50. DOI:10.1387/ijdb.041957mt.
10. Trumbo, P. R. (2005). The level of evidence for permitting a qualified health claim: FDA's review of the evidence for selenium and cancer and vitamin E and heart disease. *J. Nutr.*, 135, 354-56. DOI:10.1093/jn/135.2.354.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТЕКТИВНЫХ СВОЙСТВ ВИТАМИНА Е ОТНОСИТЕЛЬНО КОСТНОГО МОЗГА КРЫС В УСЛОВИЯХ ПОВЫШЕННОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ СОЛЕЙ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

Линдіна Ю.Н., Сікора В.В., Гирявенко Н.І., Линдін М.С., Романюк А. Н.

Аннотация. При нарушении гомеостаза происходят изменения качественных и количественных характеристик всех ростков кроветворения. Это побуждает к поиску эффективного протективного средства в условиях загрязнения окружающей среды. Целью нашего исследования стало изучение протективных свойств витамина Е относительно костного мозга крыс в условиях повышенного потребления солей тяжелых металлов. Исследование проведено при изучении костного мозга у 36 лабораторных крыс-самцов. Срезы декальцинированных бедренных костей окрашивали гематоксилином и эозином, по Ван-Гизону и ШИК-реакцией, с помощью иммуногистохимического исследования рецепторов к CD3, CD79?, S100 и MPO. Элементный состав гемопоэтической ткани установлен путем атомной спектрофотометрии. Накопление тяжелых металлов в гемопоэтической ткани приводило к развитию микроэлементоза (изменение качественных и количественных показателей всех ростков гемопоэза и окружающих тканей). По мере пролонгации влияния экзогенных поллютантов происходило подавление эритроцито- и лейкоцитопоэза, синхронный рост количества мегакариоцитов. Эти параметры достигали значительных уровней отклонения на 90 сутки наблюдения. Использование витамина Е в качестве корректора приводит к уменьшению негативного воздействия поллютантов, что проявляется меньшим накоплением тяжелых металлов в костном мозге, предупреждением значительных отклонений в количественном и качественном составе кроветворной ткани.

Ключевые слова: костный мозг, тяжелые металлы, микроэлементоз, эритропоэз, гранулоцитопоэз, мегакариоцит.

THE STUDY OF THE PROTECTIVE PROPERTIES OF VITAMIN E ON BONE MARROW OF RATS IN CONDITION OF THE INCREASED INTAKE OF HEAVY METALS SALTS

Lyndina Y., Sikora V., Hyriavenko N., Lyndin M., Romaniuk A.

Annotation. Homeostasis imbalance leads to the changes in qualitative and quantitative characteristics of all hematopoietic sprouts. It encourages to search for the effective protective means in the conditions of the polluted environment. Our research is focused on the study the protective properties of vitamin E on the bone marrow of the rats in conditions of the increased intake of the heavy metals salts. During the research the bone marrow of the 36 laboratory male rats was studied. The sections of the decalcified femoral bones were stained using hematoxylin and eosin method, Van Gieson's technique and PAS-reaction, as well as immunohistochemical study to CD3, CD79?, S100 and MPO was used. Elemental composition of hematopoietic tissue was determined through atomic spectrophotometry. The accumulation of the heavy metals led to microelementosis (changes in qualitative and quantitative characteristics of all hematopoietic sprouts and surrounding tissues). The extension of the influence of the exogenous pollutants led to the suppression of erythro- and leucopoiesis, synchronous increase in the number of megakaryocytes. These indicators reached the significant deviations on the 90 day of the observation. The use of the vitamin E as a corrector reduces the negative effect of the pollutants that is demonstrated by the reduced accumulation of the heavy metals in the bone marrow, prevention of the significant deviations in the quantitative and qualitative composition of hematopoietic tissue.

Keywords: bone marrow, heavy metals, microelementosis, erythropoiesis, granulocytopenia, megakaryocyte.