

DOI: <https://doi.org/10.32345/2664-4738.3-4.2018.05>
УДК 616-001.17-001.4-003.9:616.153.455-008.61:611-018.46

ДИНАМІЧНІ ЗМІНИ КЛІТИННОГО СКЛАДУ КІСТКОВОГО МОЗКУ ЩУРІВ ПРИ ЗАГОЄННІ ОПІКОВОЇ РАНИ В НОРМІ ТА ЗА УМОВ ГІПЕРГЛІКЕМІЇ

Рижко І.М., (ORCID 0000-0003-0588-7969),

Напрус Л.В. (ORCID 0000-0002-0416-2600)

*Науково-дослідний інститут експериментальної та клінічної медицини,
Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, Київ, Україна
Lnatrus777@gmail.com*

Актуальність. Вивчення потенціалу гемопоетичних попередників сьогодні набуває особливої актуальності у зв'язку із використанням гемопоетичних клітин як основного матеріалу трансплантації для лікування різних захворювань, в т. ч. трофічних язв при цукровому діабеті (ЦД).

Мета: вивчити динамічні коливання клітинного складу кісткового мозку (КМ) щурів за показниками мієлограми при загоєнні опікової рани в нормі та за умов гіперглікемії.

Матеріали та методи. Досліджували динаміку (3, 7, 14, 21 доба) гоєння опікової рани шкіри щурів лінії Вістар. Сформовано дві групи: без соматичної патології – група контролю (n=24), та з експериментальним стрептозотоциновим ЦД (n=24). Рівень глюкози в крові у щурів з ЦД – $24,24 \pm 0,79$ ммоль/л проти $8,03 \pm 0,4$ ммоль/л в контрольній групі. Під ефірним наркозом моделювали опік із використанням мідних пластин у вигляді еліпсу. Загальна площа опіку шкіри складала 18-20 % поверхні тіла. Дослідження мієлограми проводили за стандартним методом М. І. Арінкіна, матеріал кісткового мозку вимивали з дистального кінця стегнової кістки. Мазки фіксували етанолом і фарбували за Романовським-Гімзою. На кожному склі підраховували 500 клітинних елементів, визначали кількість клітин кожного виду і перераховували у відсотки. Мікроскопію проводили під імерсією при збільшенні 100Ч10. Усі показники в динаміці загоєння порівнювали із показниками мієлограми, які були визначені в групі (n=12) здорових щурів, яким не відтворювався опік. Їх показники вважалися референтними значеннями (РЗ). Статистичну обробку даних проводили за допомогою пакету IBM SPSS Statistics 23.

Результати. В нормі загоєння рани супроводжується загальним підвищенням проліферації мієлоїдного зростка КМ із незначним пригніченням на 7 добу. Одночасно у всі терміни спостереження зменшується проліферація елементів еритроїдного походження КМ, але їх функціональна здібність і насиченість гемоглобіном залишається нормальною. Диференціювання клітинних елементів в КМ також підвищується, але має відмінність по термінах. До 3 доби активно диференціюються зрілі гранулоцити та моноцити. У 7 добу в складі КМ підвищується відносна кількість еозинофілів та базофілів. Вірогідно, такий перерозподіл відображає регуляцію відтворення клітин в КМ для їх виходу в периферичний кровоток та подальшої участі в процесі регенерації сполучної тканини, що забезпечує нормальне фізіологічне загоєння.

В умовах гіперглікемії спостерігається різниця у клітинному складі КМ вже на стадії загальних поліпотентних попередників: проліферація загальних клітин лімфоїдного походження зростає у 1,5 рази і за рахунок цього вміст мієлоїдного зростка знижується. На усіх термінах підвищується загальна проліферативна активність гранулоцитарних попередників. За рахунок цього у 1,5-2 рази зменшується диференціювання гранулоцитів. Особливо чутливим до гіперглікемії виявився рід базифілів та моноцитів, яких в КМ було у 1,5-2,8 рази менше, а динаміка змін у терміни спостереження також відрізнялась від контролю.

Висновок. Вплив гіперглікемії на потужність проліферації і активність диференціювання в кістковому мозку викликає перерозподіл клітинних елементів гемопоетичного походження, що відображається на кількості та функціональній спроможності клітин, які приймають участь в забезпеченні та регуляційному сигналінгу при регенерації сполучної тканини. Зміна відносного вмісту клітинних попередників в кістковому мозку та несвоєчасний вихід клітин з кісткового мозку в периферичну кров може зумовлювати порушення сценарію регенерації сполучної тканини та бути причиною трофічних виразок або незагоєні рани при цукровому діабеті.

Ключові слова. Мієлограма, проліферація, диференціювання, гемопоетичні стовбурові клітини

Актуальність. Сьогодні вивчення потенціалу клітин кісткового мозку (КМ) набуває особливої актуальності у зв'язку із використанням гемопоетичних попередників, як основного матеріалу трансплантації для лікування різних захворювань, в тому числі трофічних поразок при цукровому діабеті

(ЦД). Для України вивчення потенційних можливостей клітин КМ має найбільшу актуальність, оскільки 17.05.2018 року набув чинності Закон України «Про застосування трансплантації анатомічних матеріалів людині» [12].

Вважається, що соматичні клітини, які активно поділяються лише в ембріональному періоді, а пізніше втрачають таку можливість, можна замінити/стимулювати клітинами, взятими із пуповинної крові, що надає надію компенсувати такі стани, які сьогодні вважають невиліковними (безпліддя, хвороби Паркінсона та Альцгеймера та ін.) [5]. В той самий час активне використання стовбурових клітин наштовхується на серйозні перешкоди у вигляді подальшого неконтрольованого поділення, що призводить до малігнізації, саме тому процес використання стовбурових клітин продовжує ще активно вивчатися [2].

Стовбурові гемопоетичні клітини не втрачають своїх властивостей проліферувати все життя. В кістковому мозку знаходяться більшість гемопоетичних стовбурових клітин, але деякі клітини, які називаються стовбуровими клітинами периферичної крові, знаходяться у кровотоку. Вірогідно, вони можуть надавати пул уніпотентних клітин гемопоетичного походження для відтворення клітин сполучної тканини, які необхідні для репарації [7].

Кістковий мозок – це м'яка губчата речовина, яка знаходиться всередині кісток (хребці, ребра, грудина, плечовий пояс, тощо). КМ виробляє близько 500 мільярдів клітин крові. Цей процес – безперервний. Кістковий мозок містить незрілі стовбурові клітини – гемопоетичні, які відрізняються від ембріональних стовбурових клітин тим, що утворю-

ють кровоутворюючі стовбурові клітини, або один з трьох видів клітин крові: лейкоцити, тромбоцити, еритроцити.

В ембріології розрізняють тоті-, плюри-, мульти- та уніпотентні клітини, які відрізняються за своєю потенційною здібністю диференціюватися у будь-який тип клітин організму або розвиватися у всі типи клітин тільки в межах певного зародкового шару [8].

Згідно з сучасними уявленнями [9], в основі «генеалогічного дерева» всіх клітинних елементів крові лежить поліпотентна стовбурна клітина – гемоцитобласт – морфологічно схожа на лімфоцит. Основними властивостями гемопоетичних стовбурових клітин є здатність до проліферації (клітинного поділення) з подальшою диференціацією (розвитком) у певному напрямку. Стовбурні кровотворні клітини мають унікальну властивість – поліпотентність, тобто властивість диференціюватися в усі лінії гемопоезу (рис. 1).

Згідно сучасній унітарній теорії кровотворення [8], клітини умовно діляться на 6 класів. Клас 1 – представлений стовбуровими клітинами, основна маса яких (90 %) знаходиться в стані спокою клітинного циклу, і тільки біля 10 % із них діляться. Клас 2 – представлений поліпотентними клітинами, які дають початок лімфопоезу або мієлопоезу. Клас 3 – уніпотентні клітини-попередники дають поча-

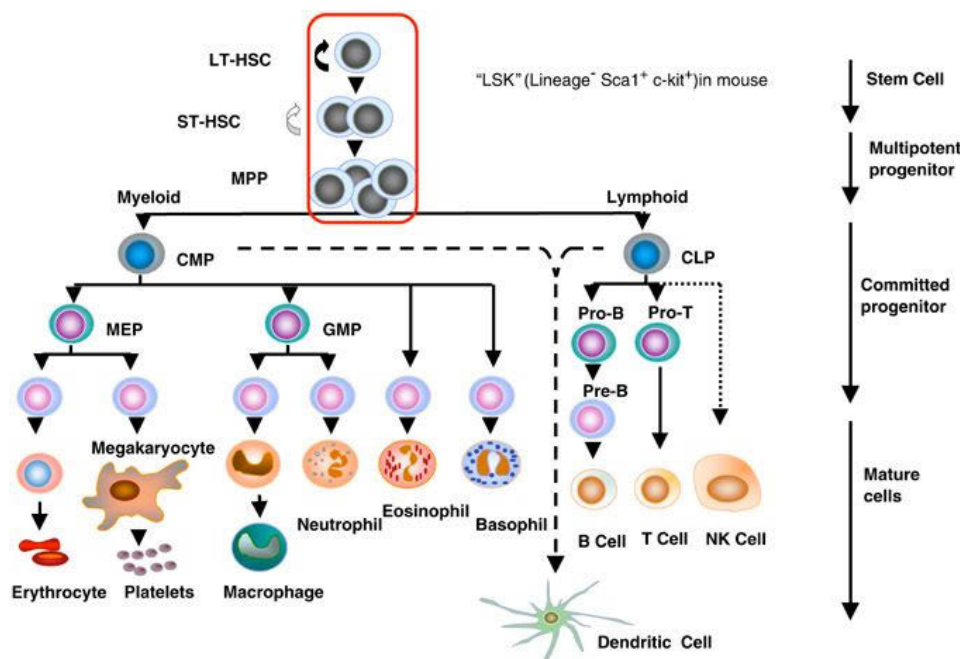


Рис. 1. Схема ієрархії гемопоетичних клітин.

LT-HSC (Hematopoietic Stem Cells) – MPP (Multipotent progenitor cells) – мультипотентні родоначальники; CMP (Common Myeloid Progenitor) – загальний мієлоїдний попередник; CLP – (Common Lymphoid Progenitor) лімфоїдний попередник; MEP (Megakaryocyte-Erythroid Progenitor) – попередники мегакариоцитів/еритроцитів; GMP – (Granulocyte-Macrophage Progenitor) попередник гранулоцитів/макрофагів.

ток одному певному ряду клітин: лімфоцитам, моноцитам, гранулоцитам (еозинофілам, базофілам, нейтрофілам), еритроцитам і тромбоцитам. Клітини, що належать до перших трьох класів, морфологічно не розрізняються, тому їх називають недиференційованими (або загальними) бластами. Клас 4 – клас морфологічно проліферуючі клітини, які можна морфологічно розрізнити. Вони дають початок рядам кровотворення. Клас 5 – представлений дозріваючими клітинами, назва яких починається префіксом “про” (перед): промієлоцит, пролімфоцит, промоноцит, промегакаріоцит та інші. Клас 6 – клас зрілих клітин периферійної крові, які не здатні до подальшої диференціації і мають обмежений життєвий цикл. В нормі клітини 1-5 класів знаходяться в кровотворних органах, і тільки клітини 6 класу мають здатність долати кістково-мозковий бар’єр і впливати в периферійну кров. Клітини, які утворюються в кістковому мозку, по мірі дозрівання рівномірно поступають у кров’яне русло для виконання своєї функції.

Під час травми в організмі клітини різних тканин пошкоджуються або гинуть, і за цих умов стовбурові клітини активуються, щоб відновити пошкоджені тканини [6]. Яскравим прикладом є пошкодження сполучної тканини, яка є вмістом великої кількості клітин кровотворного походження. Тому вивчення стану КМ, його проліферативної потужності і процесу диференціювання клітин на тлі процесів регенерації сполучної тканини має особливу актуальність.

Мета: вивчити динамічні коливання клітинного складу кісткового мозку (КМ) щурів за показниками мієлограми при загоєнні опікової рани в нормі та за умов гіперглікемії.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження динаміки (3, 7, 14, 21 доба) гоєння опікової рани шкіри проводили на статевозрілих щурах-самцях лінії Wistar масою 180-210 г. Групу контролю (n=24) склали тварини без соматичної патології. Тваринам моделювали опік шкіри та виводили із експерименту на вказані терміни (по 6 щурів). Стійку некориговану гіперглікемію моделювали в експерименті введенням тваринам стрептозотозину внутрішньоочередно одноразово в дозі 50 мг/кг не менше ніж за місяць до нанесення опіку шкіри. В експериментальну групу (n=24) були відібрані тварини за рівнем глюкози натще $12,56 \pm 1,44$ ммоль/л проти $5,31 \pm 0,27$ ммоль/л в контрольній групі. Вважали, що вказана модель надає підставу вивчати зміни в тканинах, які характерні для цукрового діабету (ЦД) 1 типу, тому групу визначили як «ЦД». Тваринам групи ЦД також моделювали опік шкіри та виводили із експерименту на вказані терміни (по 6 щурів). Усі показники в ди-

намці загоєння порівнювали із показниками мієлограми, які були визначені в групі (n=12) здорових щурів, яким не відтворювався опік. Їх показники вважалися референтними значеннями (РЗ) і група визначалась як «РЗ».

Усі маніпуляції з піддослідними тваринами проводили з дотриманням загальноприйнятих біоетичних норм гуманного поводження з лабораторними тваринами у відповідності до міжнародних та національних положень стосовно проведення експериментів із залученням тварин: «Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986); «Загальні етичні принципи проведення експериментів на тваринах» (Україна, 2001 р.), Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 3447-IV (Україна, 2006), засідання Комісії з біоетики НМУ, протокол № 94 від 16.03.2016.

Для експериментального моделювання опіку напередодні, в умовах вільної поведінки, щурам оголювали прямокутну ділянку шкіри тулуба шляхом нанесення крему для депіляції з експозицією 4-5 хвилин. Шкіру після процедури обробляли фізіологічним розчином і антисептиком, при цьому вона була не пошкодженою, рівномірно гладенькою, без волосяного покриву. Наступного дня, на щурах під дією ефірного наркозу моделювали опік. Використовували дві мідні пластини у вигляді еліпсу, розміром 3,7x4,5 см і площею 0,0052 м². Пластини витримували в окропі 10 хвилин і накладали одночасно симетрично на обидві оголені частини тіла щурів, з експозицією 10 секунд. Площу термічного ушкодження шкіри розраховували від площі поверхні тіла щура. Загальна площа опіку шкіри складала 18-20 % поверхні тіла, що є цілком достатнім для формування опіку II ступеня – дермального поверхневого опіку. Щурів виводили із експерименту шляхом декапітації після введення однократно внутрішньоочередно летальної дози тіопенталу натрію.

Дослідження мієлограми проводили за стандартною за методом [10]. Для отримання кісткового мозку відділяли стегнову кістку щура, відокремлювали її від м’яких тканин. Для приготування мазків матеріал кісткового мозку вимивали з дистального кінця стегнової кістки на знежирене предметне скло. Мазки фіксували етанолом і фарбували за Романовським-Гімзою. На кожному склі підраховували 500 клітинних елементів, визначали кількість клітин кожного виду і перераховували у відсотки. Мікроскопію проводили під імерсією при збільшенні 100x10.

Стандартом морфологічного дослідження кісткового мозку є підрахунок його формених елементів та відсоткове процентне співвідношення всіх кровотворних клітин кісткового мозку (мієлокаріо-

цітов). Оцінюють морфологічні особливості клітин, кінетику дозрівання і складають висновок по мієлограмі в цілому. Основними морфологічними особливостями клітини є такі критерії: розмір клітини, ядерно-цитоплазматичне співвідношення, колір цитоплазми та наявність зернистості, структура хроматину ядра, наявність у ньому ядерець. Підраховують всі мієлокаріоцити, що зустрічаються в полі зору, не менше 500 клітин в різних ділянках трьох або більше препаратів, реєструють їх число за допомогою лічильника та обчислюють відсоткове співвідношення кожного виду клітин. Підрахунок мегакаріоцитів в забарвлених мазках кісткового мозку проводиться окремо під малим збільшенням (10x10, 20x10), їх кількість не входить у вказане 100 % співвідношення.

Статистичну обробку даних проводили за допомогою пакету IBM SPSS Statistics 23. Для перевірки розподілу на нормальність використано критерій Шапіро-Уїлка. Середні значення в виборці вказували із стандартною похибкою та довірчим інтервалом 95 %. Порівняння показників на всіх термінах спостереження проводили шляхом множинного порівняння за критерієм Шеффе. Порівняння середніх значень між групами у відповідні терміни проводили за критерієм Стьюдента (програма MedStat).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Співвідношення клітинних елементів КМ за зростками, інтенсивність їх проліферативної активності, а головне, витриманість строків диференціювання клітин визначає потенційні можливості участі клітин периферичної крові та сполучної тканини в процесі загоєння рани (рис. 1). Тому для вивчення особливостей динаміки гемопоезу (в нормі та за умов експериментального ЦД) при наявності регенераційного вогнища в організмі ми проводили покрокове порівняння популяцій клітинних елементів,

які були визначені в мієлограмі, за певними морфологічними ознаками [10].

Найбільшу проліфераційну активність мають бласти, які визначають два головних зростка: CMP (Common Myeloid Progenitor) – клітин лейкоцитарного походження (або загальних мієлоїдних попередників), та CLP (Common Lymphoid Progenitor) – клітин лімфоїдного походження (рис. 2). При підрахунку вони в сумі складають 100 %, а їх співвідношення аналізують як лейкоеритробластичне. Пул CMP визначається як сума клітин, які мають морфологічні ознаки мієлоїдного зростка. Серед них найбільш численна група GMP (Granulocyte-Macrophage Progenitor) – гранулоцитарно-моноцитарні попередники, в якій ми визначили гранулоцитарні клітини на різних стадіях зрілості: групу незрілих (GRA1) та зрілих (GRA2) гранулоцитів КМ; MEP (Megakaryocyte-Erythroid Progenitor) попередники мегакаріоцитів та еритроцитів. Також CMP є попередниками еозинофілів, базофілів (тканинних), тучних клітин і клітин моноцитарного зростка.

Головною морфологічною відзнакою клітин мієлоїдного ряду (GMP) є наявність в цитоплазмі зернистості, специфічної для певного виду клітин: нейтрофілну, еозинофілну і базофілну. Нейтрофілна зернистість рожево-фіолетового забарвлення, частіше пілоподібна, рясна, не завжди рівномірно заповнює цитоплазму. Еозинофілна зернистість однорідна за кольором, формою і розміром, велика, займає всю цитоплазму. У більш зрілих клітин має цегельно-рожевий колір (кетова ікра), в молодих еозинофілів має коричневий і буро-синій відтінок. Базофілна зернистість частіше фіолетового, рідше чорного кольору, неоднорідна за розміром і формою, зазвичай невеличка, розташовується на фоні ядра і по цитоплазмі. Клітини проліферуючого паростку GMP мають високе ядерно-цитоплазматичне співвідношення, клітини дозріваючого пулу вже

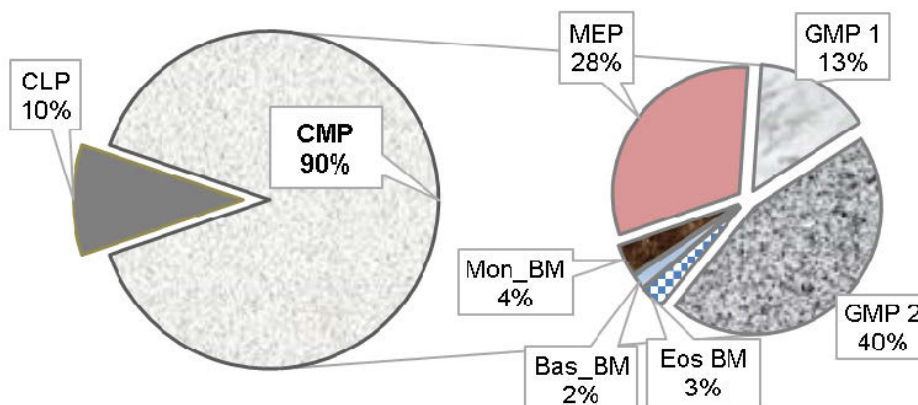


Рис. 2. Схема розподілу клітинних елементів при підрахунку мієлограмі в нормі у інтактних шурів (група P3).

мають сегментоване ядро. Моноцит КМ – це крупна клітина розміром до 20 мкм. Ядро світло-фіолетового кольору, може мати різну форму – круглу, овальну, підковоподібну, кільцевидну, у вигляді петлі, метелика, грибу, іноді може бути сегментованим. Структура хроматину крупно-сітчаста, петляста. Ядро займає більшу або рівну з цитоплазмою частину клітини. Цитоплазма сірувато-блакитна, димчаста, нерідко містить пиловидну азурофільну зернистість і вакуолі.

Серед blastів ми окремо відділили клітини зростка СLP. В нормі, при відсутності гематологічного захворювання, в КМ зустрічаються тільки зрілі лімфоцити. Відрізняються лімфоцити КМ розміром – вони найменші (до 10 мкм), їх ядро зазвичай кругле, овальне, іноді бобоподібне. Ядро має грубу структуру, частіше із грубих грудок базіхроматину і оксіхроматину, що складає враження глибокого. Ядро забарвлюється в темно- або світлофіолетовий колір, цитоплазма лімфоцита світло-синя з проясненням навколо ядра.

Ми проаналізували динаміку СМР та СLP у вказаних групах щурів (рис. 3).

У інтактних щурів без наявності рани (група РЗ) в КМ значно переважають загальні мієлоїдні попередники: СМР (89,5±1,5 %) проти СLP (10,5±0,4 %).

Опікова рана в КГ не викликає суттєвих змін кількості СМР. У всі терміни спостереження значення утримується біля 90 %, із незначним недостовірним зниженням на 7 добу до 86,55±2,19 %.

В групі ЦД кількість СМР має хвилюве коливання: підвищення на 3 та 14 добу до 89,75±2,74 %, та 86,03±2,07 %, із зниженням на 7 і 21 добу до 84,75±1,78 %, та 83,33±1,5 %. Достовірні

відмінності середніх показників загальних мієлоїдних попередників КМ в групах виявилися на 21 добу на рівні значимості $p=0,041$.

Відповідно, в КГ при виникненні пошкодження, кількість лімфоїдних попередників КМ достовірно ($p<0,05$) підвищується лише на 7 добу до 13,5±0,9 % з у порівнянні зі значенням на 3 добу 10,5±0,4 %, але на 14 знову знижується до попереднього значення і залишається таким на 21 добу.

В групі ЦД динаміка вмісту СLP була хвилювою: вже на 3 добу 10,25±0,4 %, 7 добу – 15,25±1,8 %, 14 добу 14,16±1,4 %, 21 добу 16,6±1,3 %. У порівнянні із групою РЗ усі відмінності в динаміці 7, 14, 21 доба достовірні ($p<0,05$). Відмінності в групах КГ та ЦД були статистично достовірні на 14 добу ($p=0,03$), та 21 добу ($p=0,003$).

Одже, в нормі при виникненні ранового вогнища в сполучній тканині на 7 добу виникає коливання клітинних елементів КМ вже на рівні загальних попередників СМР/СLP. Загоєння рани викликає функціональний перерозподіл: кількість мієлоїдних попередників зменшується відносно РЗ, а кількість лімфоїдних, відповідно, збільшується. Вже на 14 добу СМР/СLP кількість повертається до значень РЗ. Вважаємо, що це пов'язане із виходом нейтрофілів та моноцитів у периферичну кров, як ми показали у попередніх роботах [1].

В групі ЦД кількість мієлоїдних попередників є меншою відносно КГ у всі вказані терміни, і динаміка СМР хвилюва. Кількість лімфоїдних попередників в групі ЦД підвищується із максимальним зростанням на 21 добу.

Таким чином, за умов гіперглікемії потенціальна можливість забезпечити пул клітин мієлоїдного

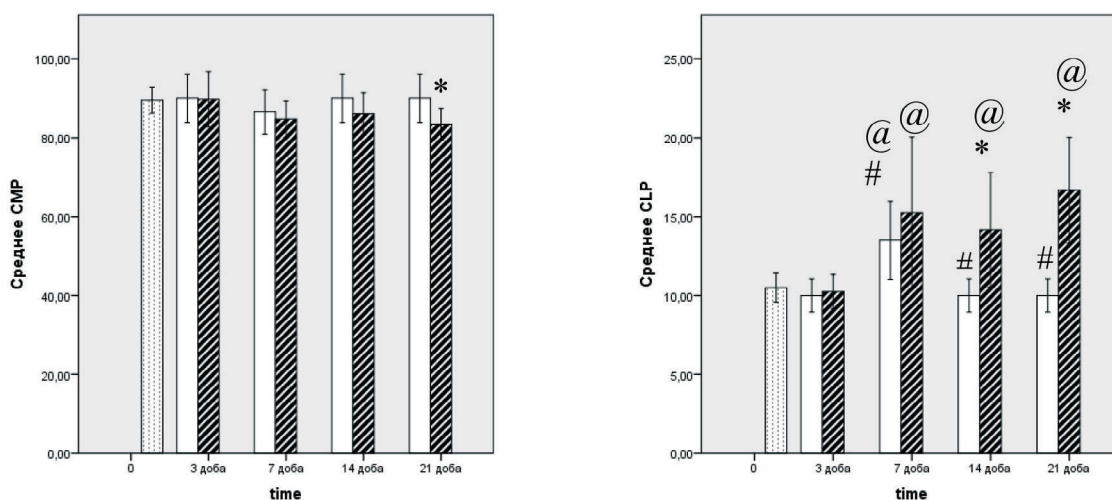


Рис. 3. Динаміка відносної кількості (%) клітинних елементів основних гемопоетичних зростків КМ: клітин лейкоцитарного походження (А) та клітин лімфоїдного походження (Б) в динаміці загоєння опікової рани.

Білі стовпчики – група контролю, посмуговані стовпчики – група ЦД, стовпчик з крапками – РЗ.

Примітка: * - відмінність в групах КГ та ЦД у вказаний термін, # - відмінність в групі при порівнянні із попереднім терміном, @ - відмінність у порівнянні із РЗ.

ряду зменшується вже на рівні СМР/СЛР із переважанням проліфераційної активності загальних лімфоїдних попередників.

Наступним кроком роботи був аналіз клітин групи СМР, як найбільш численних та поліпотентних попередників із високим потенціалом до проліферації. В групі клітин еритроїдного ряду (МЕР) ми вивчали динаміку кількості бластів (рис. 4) та розраховували Індекс дозрівання еритрокаріоцитів, або «гемоглобінізації», як співвідношення гемоглобінізованих еритрокаріоцитів до всіх клітин еритроїдного ряду.

Створення опіку характеризувалося зниженням МЕР відносно РЗ. Вже на 3 добу у щурів КГ викликало достовірне зниження еритроїдних попередників у порівнянні з РЗ ($28 \pm 1,3\%$) в 1,4 рази ($p < 0,05$) до $20,2 \pm 1,1\%$, але потім відносна кількість

МЕР поступово достовірно зростала і на 14 добу ($p < 0,05$) досягала значення $27,5 \pm 1,6\%$. Але к 21 добі знову зменшувалося до $23,2 \pm 1,4\%$.

В групі з ЦД показники клітин МЕР були збільшені в усі терміни дослідження у порівнянні з КГ і у порівнянні із РЗ ($p < 0,05$). На 3 добу складало $32,5 \pm 1,8\%$, подальше підвищення спостерігалось на 7 та 14 добу до значень $35,2 \pm 1,3\%$.

Таким чином, в нормі опікова рана викликає зниження МЕР в КМ із поступовим підвищенням показників до РЗ, а на тлі ЦД показник МЕР також має тенденцію до підвищення на 7 і 14 добу, але показники в групі були достовірно вище, ніж в КГ та в групі РЗ.

Така різниця в динаміці МЕР, на наш погляд, дуже несподівана. Вірогідно, в нормі спостерігається зниження продукції МЕР за рахунок активності

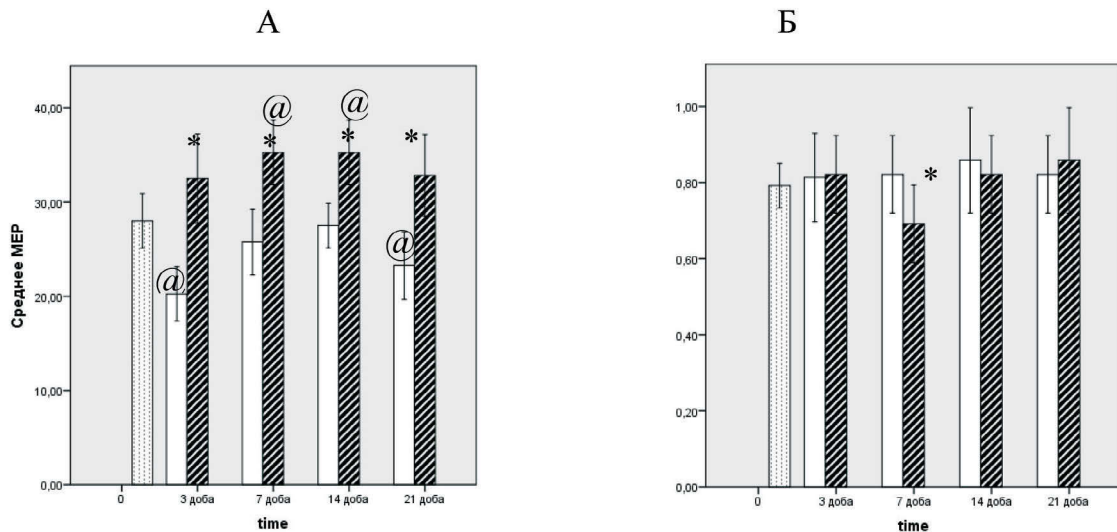


Рис. 4. Динаміка відносної кількості (%) клітинних елементів еритроїдного ряду КМ (А), та індексу гемоглобінізації еритрокаріоцитів (Б) в динаміці загоєння опікової рани. Позначення як на рис. 3.

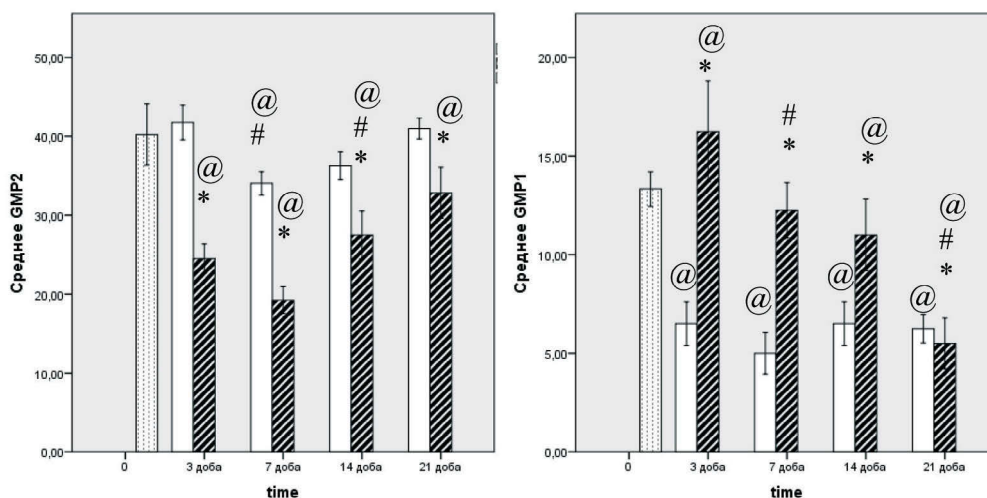


Рис. 5. Динаміка відносної кількості (%) клітинних елементів попередників гранулоцитів зрілих (А) та незрілих (Б), в динаміці загоєння опікової рани. Позначення як на рис. 3.

ланки гранулоцитарного зростка, який входить в загальний СМР, і це компенсаторно знижує долю МЕР. За умов ЦД доміантним збудником зростка СМР є тотальна гіпоксія тканин за рахунок глікірованого гемоглобіну і т. п., що є характерним для гіперглікемії, тому в КМ йде перерозподіл проліферації на пул МЕР.

Функціональна спроможність еритроцитів за ІСЕ в нормі практично не змінюється в динаміці загоєння рани і не відрізняється від показників РЗ. За умов ЦД цей показник має більші коливання, із мінімумом на 7 добу.

Наступним кроком ми вивчали особливості розподілу клітинних елементів гранулоцитарних попередників. В складі групи GMP ми визначили гранулоцитарні клітини на різних стадіях зрілості: групу незрілих (GRA1) та зрілих (GRA2) гранулоцитів КМ. Відомо, що в нормі нейтрофільні гранулоцити накопичуються в КМ після їх кінцевого диференціювання як в депо, їх вміст складає до 9/10 у порівнянні із циркулюючим пулом в периферичній крові, а їх вихід в периферичний кровоток відбувається за потреби організму під впливом ряду регуляторних сигналів. Пул незрілих попередників гранулоцитів відображає ступень проліферації в КМ. Саме тому, для оцінки потенціалу продукції усіх типів гранулоцитів має сенс розглянути і бластні форми цих клітин в динаміці загоєння рани (рис. 5).

У щурів КГ спостерігається достовірне ($p < 0,05$) зниження GMP2 на 7 добу до $34,0 \pm 0,5$ % від $41,7 \pm 0,8$ % значень 3 доби та $40,2 \pm 0,5$ % значень РЗ, із поступовим поверненням на 21 добу до значень РЗ. Така динаміка пояснюється виходом у периферичний кровоток нейтрофільних гранулоцитів для подальшої міграції клітин у тканини. Вміст GMP1 в КГ має хвильову динаміку, різко достовірно ($p < 0,05$) знижується в 2 рази відносно РЗ, що також пояснюється зниженням проліферації і максимальним диференціюванням клітин в цей період.

В групі ЦД картина суттєво відрізняється. Загальна кількість GMP2 практично в 2 рази нижче, ніж у КГ та РЗ у весь термін спостереження. Значення показника на 3 добу складає $24,5 \pm 0,7$ %, із мінімумом на 7 добу – $19,25 \pm 0,6$ %, і потім підвищується до $32,8 \pm 1,2$ % на 21 добу. Показник GMP1 в групі ЦД, навпаки, в 2,5 рази вище, ніж в КГ та РЗ. На 3 добу має максимум $16,25 \pm 0,9$ % і поступово знижується до $5,5 \pm 0,5$ % на 21 добу.

Така динаміка попередників гранулоцитів надає підставу стверджувати, що за умов ЦД в КМ переважає проліферація гранулоцитарних попередників, а диференціювання клітин значно погіршується, і тому суттєво зменшується кількість функціонально спроможних нейтрофільних гранулоцитів – клітин, які мають найважливіше значення у процесі загоєння рани.

Наступним кроком ми розглянули динаміку розподілу клітин 6 класу – найбільш диференційованих, які вже в змозі долати кістково-гематичний бар'єр і виходити в периферичний кровоток (рис. 6).

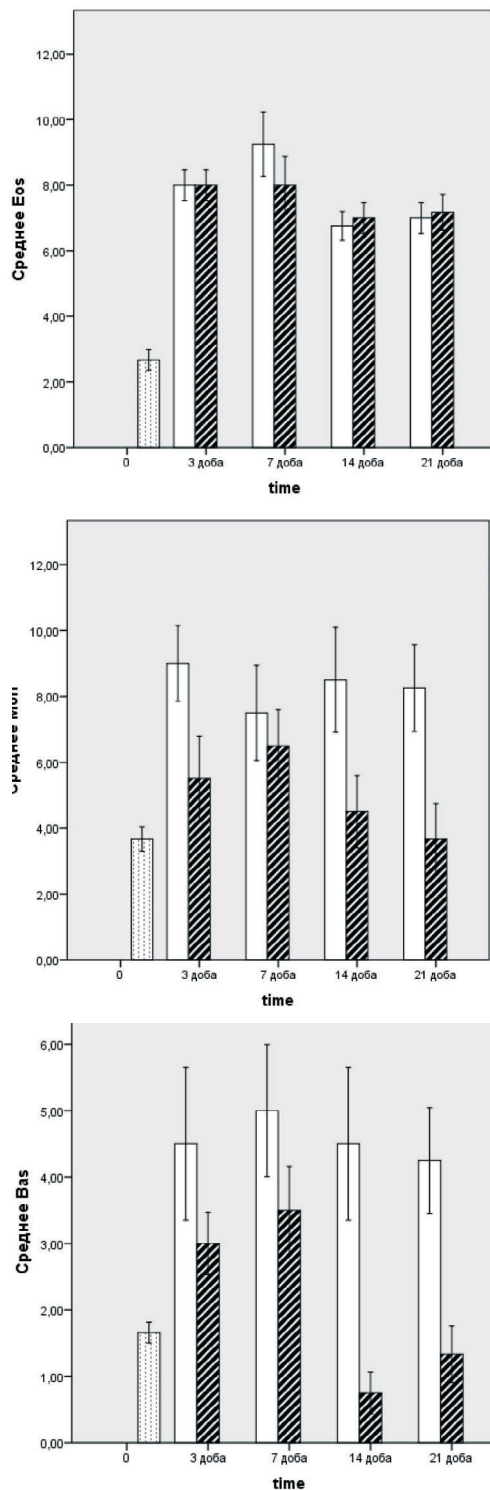


Рис. 6. Динаміка відносної кількості (%) клітинних елементів КМ попередників еозинofilів (А) та базофилів (Б), моноцитів (С) в динаміці загоєння опікової рани. Позначення як на рис. 3.

Створення опіку в нормі викликає в КМ значне, практично в 2-3 рази, достовірне ($p < 0,05$) підвищення еозинофілів відносно РЗ в усі терміни спостереження. На 3 добу спостерігали $8,0 \pm 0,1$ %, на 7 добу достовірно підвищувалося ($p < 0,05$) до максимального значення $9,2 \pm 0,3$ %, із поступовим, але достовірним ($p < 0,05$) зменшенням на 14 та 21 добу до значень $6,7 \pm 0,17$ % і $7,0 \pm 0,18$ %, відповідно.

В групі ЦД динаміка була схожою із КГ. Різниця була в тому, що максимальне значення на 7 добу складало $8,0 \pm 0,3$ %, коливання по строкам були не достовірні. Але відмінність від РЗ була достовірною в усі терміни ($p < 0,05$).

Суттєва розбіжність показників КМ спостерігалася у базофілів. В КГ показник попередників базофілів практично в 2,5 рази ($p < 0,05$) перевищував значення РЗ ($1,6 \pm 0,07$ %) у весь термін спостереження. На 3 добу підвищувався вже до $4,5 \pm 0,44$ %, максимуму сягав на 7 добу: $5,0 \pm 0,3$ %, із незначним поступовим зниженням на 14 та 21 добу до $4,2 \pm 0,3$ %.

В групі ЦД також цей показник був у 1,5 рази вище, ніж в РЗ під час загоєння рани, але динаміка була іншою. На 3 добу кількість базофілів підвищувалася до $3,0 \pm 0,1$ %, із максимумом на 7 добу: $3,5 \pm 0,2$ % ($p < 0,05$). Потім відносна кількість клітин зменшувалася ($p < 0,05$) до $0,7 \pm 0,1$ % і знову підвищувалася до $1,3 \pm 0,1$ %.

Динаміка моноцитів в КГ була схожа на таку в групі СМР. При опіку відносна кількість цих клітин підвищувалася у 2,5 рази ($p < 0,05$) у порівнянні із РЗ ($3,6 \pm 0,1$ %) у весь період спостереження. На 3 добу спостерігалось найбільше значення: $9,0 \pm 0,4$ %. Мінімум визначено на 7 добу: $7,5 \pm 0,5$ %, із незначним підвищенням на 14 та 21 добу до $8,2 \pm 0,5$ %.

В групі ЦД динаміка відрізнялася від КГ. На 3 добу показник моноцитів складав $5,5 \pm 0,5$ %, максимум спостерігався на 7 добу: $6,5 \pm 0,4$ %, із зменшенням на 14 добу до $4,5 \pm 0,4$ %, і на 21 добу дорівнював показнику РЗ.

В нормі загоєння рани супроводжується підвищенням проліферації мієлоїдного зростка КМ із незначним її пригніченням на 7 добу. Відносна кількість клітин лімфоїдного зростка, навпаки, в цей термін підвищується. Підвищується диференціювання клітинних елементів із їх збільшенням в КМ, але цей процес має відмінність по термінах. До 3 доби активно диференціюються зрілі гранулоцити та моноцити, а на 7 добу, навпаки, цих клітин спостерігається найменша кількість. У 7 добу в складі КМ підвищується відносна кількість еозинофілів та базофілів. Активація проліферації та дозрівання клітин мієлоїдного зростка супроводжується відносним зменшенням в КМ елементів еритроїдного походження у всі терміни спостереження, але їх функціональна здібність і насиченість гемоглобіном при цьому залишається нормальною. Вірогідно, такий перерозподіл відображує регуляцію відтворен-

ня клітин в КМ для їх виходу в периферичний кровоток та для подальшої участі в процесі регенерації сполучної тканини, що забезпечує нормальне фізіологічне загоєння.

За умов гіперглікемії при загоєнні рани виявляється розбіжність в клітинному складі КМ вже на стадії ранніх попередників: активність проліферації клітин лімфоїдного походження підвищується в 1,5 рази, і за рахунок цього кількість клітин мієлоїдного зростка зменшується. На всіх термінах спостереження в 1,4 рази підвищувалася проліферація попередників еритроцитів, та в 2,5 рази підвищувалася проліферативна активність гранулоцитів КМ. За рахунок цього в 1,5-2 рази зменшувалося диференціювання гранулоцитів. Особливо чутливим до гіперглікемії виявився зросток базофілів та моноцитів, яких в КМ було в 1,5-2,8 разів менше, а динаміка змін в терміни спостереження також відрізнялася.

ВИСНОВОК

Вплив гіперглікемії на потужність проліферації і активність диференціювання в кістковому мозку викликає перерозподіл клітинних елементів гемопоетичного походження, що відображається на кількості та функціональній спроможності клітин, які приймають участь в забезпеченні та регуляційному сигналінгу при регенерації сполучної тканини. Зміна відносного вмісту клітинних попередників в кістковому мозку та несвоєчасний вихід клітин з кісткового мозку в периферичну кров може зумовлювати порушення сценарію регенерації сполучної тканини та бути причиною трофічних виразок або незагоєні рани при цукровому діабеті.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють, що не мають конфлікту інтересів, який може сприйматися таким, що може завдати шкоди неупередженості статті.

Джерела фінансування. Ця стаття не отримала фінансової підтримки від державної, громадської або комерційної організації.

REFERENCES

1. Concept of regulation of neoanogeogenesis in the regeneration of connective tissue in norm and in conditions of hyperglycemia [in Ukrainian] / L.V. Natrus, I.M. Rzhzko, T.I. Panova, Y.S. Osadchuk // *Fiziol Zh.* 2019, 65 (3): 30-1 (Annex) Access mode: http://biph.kiev.ua/images/6/69/FiziolZh-3_dod_2019.pdf
2. Concise Review: Diabetes, the Bone Marrow Niche, and Impaired Vascular Regeneration / G. Paolo Fadini, F. Ferraro, F. Quaini, T. Asahara, P. Madeddu // *J. Stem Cells Transl Med.* 2014; 3 (8): 949-57. DOI: 10.5966/sctm.2014-0052
3. Preclinical drug research: Guidelines / Ed. O.V. Stefanova. – K.: Avicena. 2001. 527 p. [in Ukrainian]. Access mode: <https://www.twirpx.com/file/537410/>

4. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Access mode: <http://conventions.coe.int/treaty/en/treaties/html/123.htm>
5. Granulocyte Colony-Stimulating Factor: A Novel Mediator of T Cell Tolerance / S. Rutella, F. Zavala, S. Danese, H. Kared, G. Leone // *J Immunol.* 2005; 175 (11): 7085-91. DOI: 10.4049/jimmunol.175.11.7085
6. Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations / S. Múndez-Ferrer, D. Lucas, M. Battista & P. S. Frenette // *J. Nature.* 2008; 452: 442-7. DOI: 10.1038/nature06685
7. Neutrophil-derived cytokines: potential therapeutic targets in inflammation / T. Kasama, Y. Miwa, T. Isozaki, T. Odai, M. Adachi, S.L. Kunkel // *J. Current Drug Targets – Inflammation & Allergy.* 2005. V. 4, No. 13. P. 273-279 DOI: 10.2174/1568010054022114
8. A guide to clinical laboratory diagnostics / Ed. M.A. Bazarnova, V.T. Morozova / K: Vyshcha shkola. 1986. V. 3. 175 p. [in Ukrainian]. Access mode: <https://www.clinlabs.com/tip-knigi/uchebnoe-posobie>
9. The role of Smad signaling in hematopoiesis and translational hematology / U. Blank, S. Karlsson // *J. Leukemia.* 2011. V. 25, No. 9. P. 1379-1388. DOI: 10.1038/leu.2011.95.
10. Kozlovskaya L., Nikolayev A. Textbook on clinical laboratory research methods. – M.: Medicine. 1984. 288 p. [in Russian] Access mode: <https://search.rsl.ru/record/01008255833>
11. The law of Ukraine «On protection of animals from ill-treatment» № 3447-IV (Ukrayina, 2006). [in Ukrainian]. Access mode: <http://zakon4.rada.gov.ua/laws/show/3447-15>
12. The law of Ukraine «On the use of human anatomical material transplantation» № 2427-VIII. [in Ukrainian]. Access mode: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/2427-19>

Отримано: 18.11.2018

DYNAMIC CHANGES IN THE BONE MARROW CELLULAR COMPOSITION OF RATS IN THE BURN WOUNDS HEALING IN NORM AND IN CONDITIONS OF HYPERGLYCEMIA

Rizhko I.M., Natrus L.V.

*Scientific research institute of experimental and clinical medicine,
Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine*

Relevance. Today the study of the potential of hematopoietic progenitors is particular relevance in connection with the use of hematopoietic cells as the main material of transplantation for the treatment of various diseases including trophic ulcers in diabetes mellitus.

Objective is study the dynamic fluctuations of the cellular composition of the bone marrow (BM) of rats according to myelogram indices during the healing of a burn wound in normal conditions and in conditions of hyperglycemia.

Materials and methods. The study of dynamics (3, 7, 14, 21 days) of burn wound of skin of rats of the Vistar line without somatic pathology “control group” (n=24) and rats (n=24) with experimental streptozotocin diabetes mellitus (CD) (Blood glucose level – 24,24±0,79 mmol/L against 8,03±0,4 mmol/L in the control group). Under etheric anesthesia the burn was simulated using copper plates in the form of an ellipse. The total area of skin burn was 18-20 % of the body surface. The study of myelogram was carried out according to the standard method of M. Arinkkin the material of the bone marrow was washed from the distal end of the femur. The stroke was fixed with ethanol and stained with Romanovsky-Gimza. On each glass 500 cell elements were counted the number of cells of each species was determined and converted to percentages. Microscopy was performed under imesium at an increase of 100Ч10. All indicators in healing dynamics were compared with those of myelogram which were determined in the group (n = 12) of healthy rats who did not reproduce the burn. Their indicators were considered to be referential values (RZ). Statistical data was processed using IBM SPSS Statistics 23.

Results. In normal wound healing is accompanied by a general increase in the proliferation of myeloid splenectomy with a slight oppression of 7 days. At the same time in all terms of observation the proliferation of elements of erythroid origin of BM decreases but their functional capacity and hemoglobin saturation remains normal. The differentiation of cellular elements in the BM also increases but differ in terms. Up to 3 days mature granulocytes and monocytes are actively differentiated. At 7th day in the BM the relative number of eosinophils and basophils is increased. Probably such a redistribution reflects the regulation of cell reproduction in the BM for their release into the peripheral bloodstream and subsequent participation in the process of regeneration of the connective tissue which provides normal physiological healing.

Under conditions of hyperglycemia the difference in the cellular composition of the BM is already at the stage of the common polypotent precursors: the proliferation of common cells of lymphoid origin increases 1,5-fold and due to this the content of myeloid contraction is reduced. On all terms of observation in 1,4 times the proliferation of erythrocyte precursors predominates and the total proliferative activity of granulocytic precursors increases by 2,5 times. Due to this in 1,5-2 times the differentiation of granulocytes decreases. Particularly sensitive to hyperglycemia was the growth of basophils and monocytes which in BM was 1,5-2,8 times smaller and the dynamics of changes in terms of observation also differed from control.

Conclusion: The effect of hyperglycemia on proliferation capacity and activity differentiation in BM causes a redistribution of cellular elements reflected on the number and functional ability of cells involved in providing and regulating signaling during connective tissue regeneration. Changes in the relative content of cellular progenitors in BM and the late release of cells from BM to peripheral blood can cause a violation of the connective tissue regeneration scenario and cause trophic ulcers or non-healing wounds in diabetes.

Key words: myelogram, proliferation, differentiation, hemopoietic stem cells

ДИНАМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА КОСТНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ ЗАЖИВЛЕНИИ ОЖГОВОЙ РАНЫ В НОРМЕ И В УСЛОВИЯХ ГИПЕРГЛИКЕМИИ

Рыжко И.М., Натрус Л.В.

Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины Национального медицинского университета имени А.А. Богомольца, Киев, Украина

Актуальность. Изучение потенциала гемопоэтических предшественников сегодня приобретает особую актуальность в связи с использованием гемопоэтических клеток в качестве основного материала трансплантации для лечения различных заболеваний, в т. ч. трофических язв при сахарном диабете (СД).

Цель: изучить динамические колебания клеточного состава костного мозга (КМ) крыс по показателям миелограммы при заживлении ожоговой раны в норме и в условиях гипергликемии.

Материалы и методы. Исследовали динамику (3, 7, 14, 21 сутки) заживления ожоговой раны кожи крыс линии Вистар-Сформировано две группы: без соматической патологии – группа контроля (n=24), и с экспериментальным стрептозототиновым СД (n = 24). Уровень глюкозы в крови у крыс с СД – $24,24 \pm 0,79$ ммоль/л против $8,03 \pm 0,4$ ммоль/л в контрольной группе. Под эфирным наркозом моделировали ожог с использованием медных пластин в виде эллипса. Общая площадь ожога кожи составляла 18-20 % поверхности тела. Исследование миелограммы проводили по стандартному методу М.И. Аринкина, материал костного мозга вымывали из дистального конца бедренной кости. Мазки фиксировали этанолом и окрашивали по Романовскому-Гимзе. На каждом стекле подсчитывали 500 клеточных элементов, определяли количество клеток каждого вида и перечисляли в проценты. Микроскопию проводили под иммерсией при увеличении 100Ч10. Все показатели в динамике заживления сравнивали с показателями миелограммы, которые были определены в группе (n=12) здоровых крыс, которым не воспроизводился ожог. Их показатели считались референтными значениями (РЗ). Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета IBM SPSS Statistics 23.

Результаты. В норме заживление раны сопровождается общим повышением пролиферации миелоидного ростка КМ с незначительным угнетением на 7 сутки. Одновременно во все сроки наблюдения уменьшается пролиферация элементов эритроидного происхождения КМ, но их функциональная способность и насыщенность гемоглобином остаётся нормальной. Дифференцировка клеточных элементов в КМ также повышается, но имеет отличие по срокам. До 3 суток активно дифференцируются зрелые гранулоциты и моноциты. В 7 день в составе КМ повышается относительное количество эозинофилов и базофилов. Вероятно, такое перераспределение отображает регуляцию воспроизводства клеток в КМ для их выхода в периферический кровоток и для дальнейшего участия в процессе регенерации соединительной ткани, обеспечивает нормальное физиологическое заживление.

В условиях гипергликемии выявляется разница в клеточном составе КМ уже на стадии общих полипотентных предшественников: пролиферация общих клеток лимфоидного происхождения возрастает в 1,5 раза, и за счёт этого содержание миелоидного ростка снижается. На всех сроках наблюдения в 1,4 раза превышает пролиферация предшественников эритроцитов, и в 2,5 раза повышается общая пролиферативная активность гранулоцитарных предшественников. За счёт этого в 1,5-2 раза уменьшается дифференцировка гранулоцитов. Особенно чувствительным к гипергликемии оказался росток базофилов и моноцитов, которых в КМ было в 1,5-2,8 раз меньше, а динамика изменений в сроки наблюдения также отличалась от контроля.

Вывод: Влияние гипергликемии на мощность пролиферации и активность дифференцировки в КМ вызывает перераспределение клеточных элементов, отображается на количестве и функциональной способности клеток, участвующих в обеспечении и регуляционных сигналинга при регенерации соединительной ткани. Изменение относительного содержания клеточных предшественников в КМ и несвоевременный выход клеток из КМ в периферическую кровь может вызывать нарушение сценария регенерации соединительной ткани и быть причиной трофических язв или незаживающие раны при СД.

Ключевые слова: миелограмма, пролиферация, дифференцировка, гемопоэтические стволовые клетки