

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

**ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОТЕКТИВНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ВІТАМІНУ Е
НА КІСТКОВИЙ МОЗОК ЩУРІВ В УМОВАХ ПІДВИЩЕНОГО
СПОЖИВАННЯ СОЛЕЙ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ**

Сумський державний університет, Медичний інститут, кафедра
патологічної анатомії, м. Суми

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

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) [1]. Однією з головних особливостей будови гемопоетичної тканини є те, що всі попередники розташовані близько з кровоносними судинами [2,3]. 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 [4].

У зв'язку з постійним розвитком промислового виробництва, зростання екзогенного впливу людини на навколишнє середовище, останнім часом особливої актуальності набули захворювання, які безпосередньо пов'язані зі зростанням кількості солей важких металів (СВМ) у навколишньому середовищі [5]. 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 у організмі [6].

Все вищезазначене спонукає до пошуку протективних препаратів, які б дозволили попередити розвиток деструктивних змін, як у КМ, так і у організмі в цілому. Враховуючи патогенетичні особливості впливу СВМ на тканини (каталізують окиснювальні реакції, активуючи перекисне окиснення 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.

Об'єкт і методи дослідження.

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 ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $FeSO_4$, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$, $Pb(NO_3)_2$ 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 гемопоезу були ідентифіковані при імуногістохімічному дослідженні препаратів з виявленням рецепторів до CD3, CD79 α , S100 та MPO. Елементний склад гемапоетичної 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.

Результати досліджень.

При вживанні СВМ у надфізіологічних концентраціях протягом 30 діб у тварин на рівні епіфізів площа, зайнята під еритроцитопоез, зменшилася на 27% ($p=0,048$), площа лейкоцитопоезу зменшилася на 4% ($p=0,43$), тромбоцитопоез зріс на 5,2% ($p=0,77$). На рівні діафізу динаміка змін у КМ мала схожі закономірності. Площа еритроцитопоезу зменшилася на 15,9%, спостерігалось поступове зниження 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% на рівні епіфізів та на 19,7% на рівні діафізу; площа гранулоцитопоезу знизилась на 13% та 14,3% відповідно, тромбоцитопоез зріс на 40% ($p=0,017$).

Поступово зменшуються розміри збережених острівців та кількість клітин у їх складі, серед яких виникають поодинокі попередники еритропоезу з явищами дисеритропоезу: ознаки каріорексису, неправильна форма ядер, міжядерні містки та інші (рис. 1).

При дослідженні змін гранулоцитарного паростку гемопоезу виявлено атипове розташування незрілих клітин (мієлобласти та промієлоцити) у центральній частині кістковомозкових комірок епіфізів та поміж інших паростків гемопоезу 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. 3.19).

В окремих випадках у КМ щурів на 90 добу експерименту виявлялися явища еозинофілії – різке зростання попередників та зрілих форм еозинофілів.

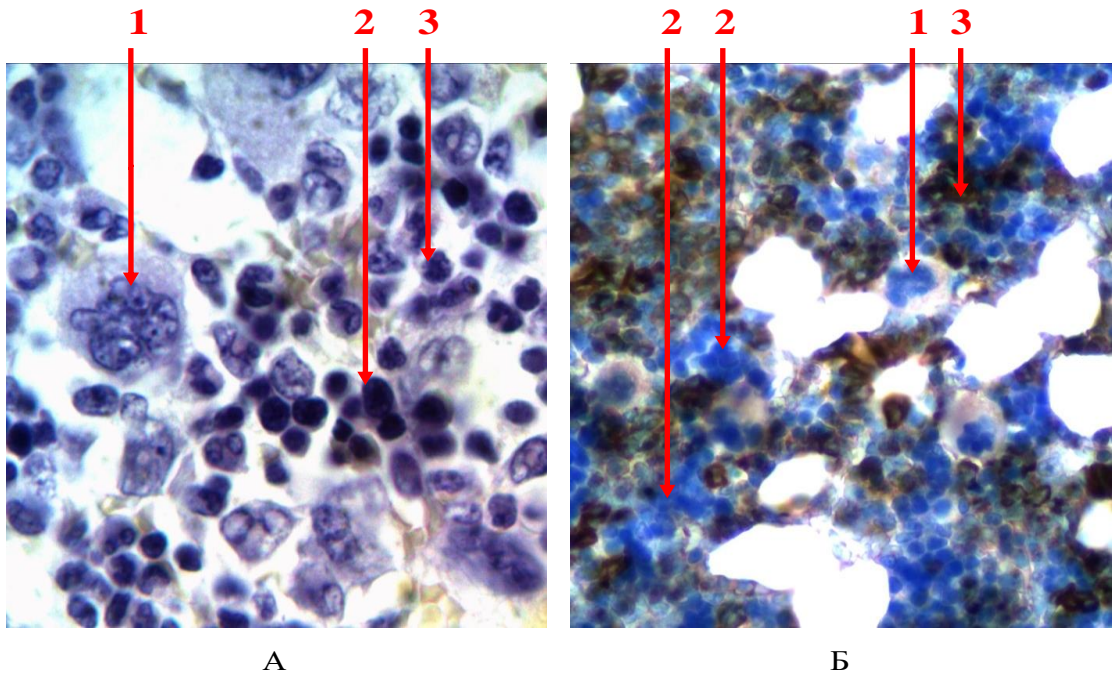


Рис. 1. Поздовжній зріз стегнової кістки щура 2-ої серії 1-ої групи. 1 – мегакаріоцит, 2 – еритроїдні островці, 3 – вогнища гранулоцитопоезу. А – забарвлення гематоксиліном та еозином, збільшення $\times 1000$. Б – імуногістохімічне дослідження рецепторів до мієлопероксидаза, збільшення $\times 400$.

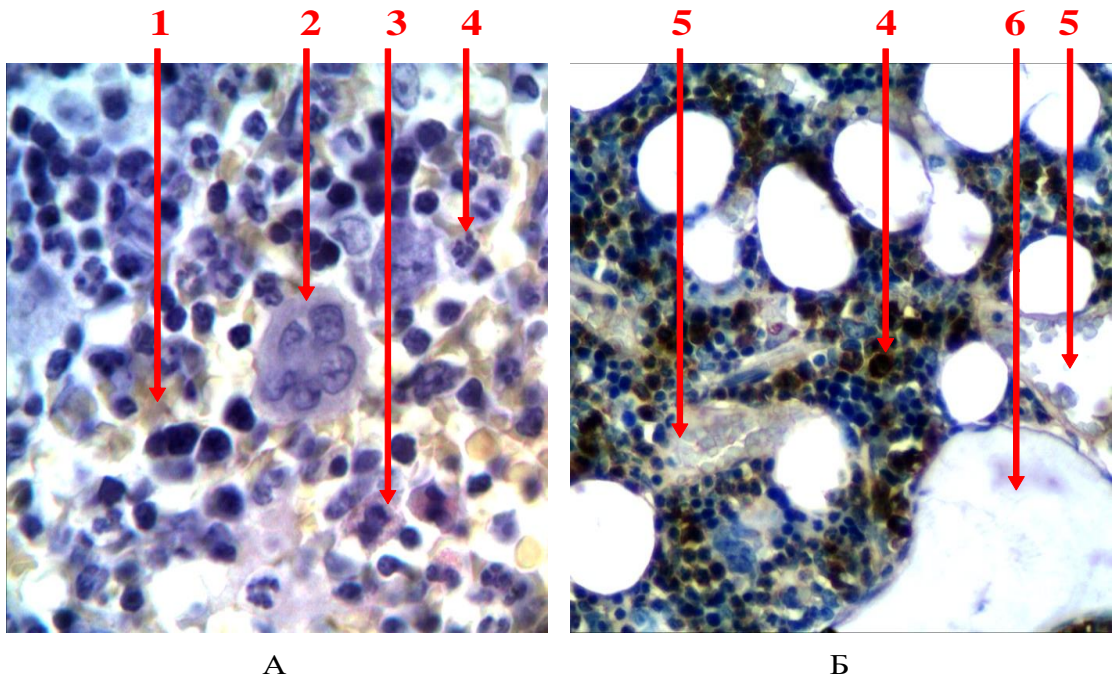


Рис. 2. Поздовжній зріз стегнової кістки щура 2-ої серії 1-ої групи. 1 – зрілі еритроцити, 2 – мегакаріоцит, 3 – еозинофільний гранулоцит, 4 – нейтрофільний гранулоцит, 5 – синусоїд, 6 – кісткова трабекула. А – забарвлення гематоксиліном та еозином, збільшення $\times 1000$. Б – імуногістохімічне дослідження рецепторів до мієлопероксидаза, збільшення $\times 400$.

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 синусоїдами. Більш яскраво проявлялися значні відхилення 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. Іноколи вони були схожі на багатоядерні клітини за рахунок наявності дуже тонких з'єднань між сегментами їх ядер.

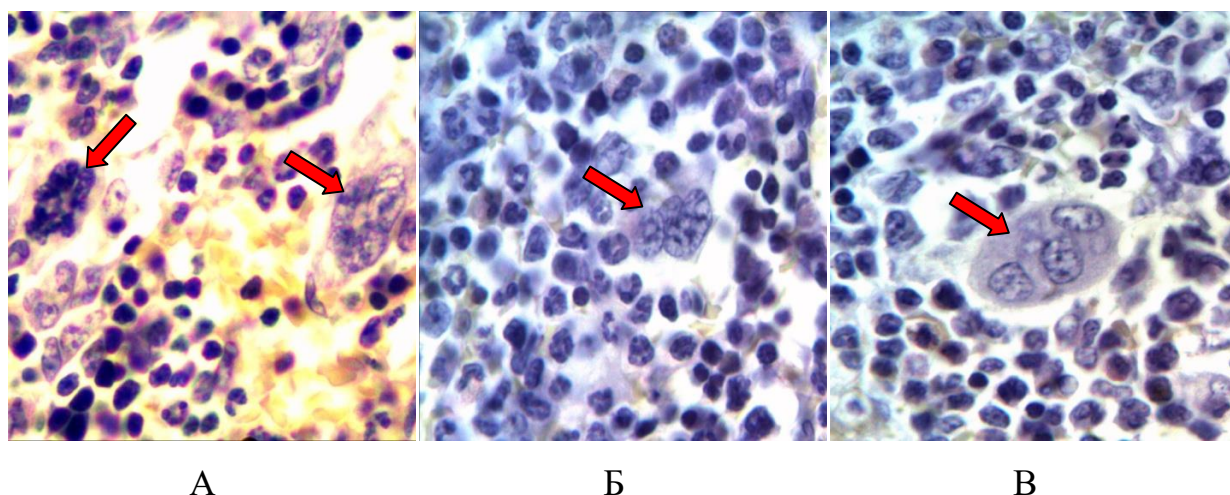


Рис. 3. Повздовжній зріз стегнової кістки щура 2-ої серії 1-ої групи.

А – явища дисмегакаріоцитопоезу (гіперхроматоз), Б – мегакаріоцити зі спустошеною цитоплазмою, В – мегакаріоцити у вигляді багатоядерних клітин. Забарвлення гематоксиліном та еозином, збільшення $\times 400$.

Досліджуючи проєктивні властивості вітаміну Е, нами встановлено, що протягом експерименту із вживанням СВМ на фоні корекції порушень вітамінотерапією спостерігається схожа 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% на рівні епіфізів та на

17,8% на рівні діафізів, площа лейкоцитопоезу зменшилась на 6,1% та 13,7% відповідно. Кількість мегакаріоцитів зростає на 25%.

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

При порівнянні показників, отриманих при атомно-абсорбційній спектрофотометрії, з результатами гістологічного дослідження встановлено, що у міру зростання кількості важких металів (ВМ) у тканині КМ статевозрілих щурів відбувається (на рівні епіфізів та діафізу) пригнічення еритроцитопоезу ($r=-0,51$, $p<0,001$ та $r=-0,46$, $p<0,001$), гранулоцитопоезу ($r=-0,28$, $p=0,017$ та $r=-0,46$, $p<0,001$) та зростання площі тромбоцитопоезу ($r=0,31$, $p=0,007$). При чому найбільший вплив на варіабельність зазначених показників (при вивченні впливу кожного з досліджених елементів) має хром (для гранулоцитопоезу $r=-0,55$, $p<0,001$, еритроцитопоезу – $r=-0,61$, $p<0,001$, тромбоцитопоезу – $r=0,38$, $p=0,0011$), а найменший – цинк ($r=-0,4$, $p<0,001$, $r=-0,52$, $p<0,001$, $r=0,27$, $p=0,019$, відповідно). Інші метали також мали значний вплив на гемопоез, хоча їх кореляційні зв'язки мали менш виражений характер, у порівнянні із зазначеними ВМ (табл. 1).

Таблиця 1

Факторний аналіз між показниками вмісту ВМ у тканині КМ щурів та площею, зайнятою під різні паростки гемопоезу (r)

	Гранулоцитопоез	Еритроцитопоез	Тромбоцитопоез
Цинк	-0,4	-0,53	0,28
Мідь	-0,36	-0,58	0,35
Хром	-0,55	-0,61	0,38
Марганець	-0,54	-0,53	0,38
Свинець	-0,6	-0,48	0,39
Залізо	-0,47	-0,45	0,31

Обговорення результатів дослідження.

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 пролонгації впливу екзогенних поллютантів відбувається пригнічення еритроцито- та лейкоцитопоезу, синхронне зростання кількості мегакаріоцитів. Дані 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 архітекtonіки 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 (9,1мг/кг), спостерігалось менш стрімке накопичення ВМ у гемопоетичній тканині, значно нижчі показники пригнічення кровотворення та якісні зміни серед усіх паростків кровотворення.

Використання вітаміну Е у якості коректора призводить до прямого конкуруючого ефекту з деякими ВМ – його окислювальне руйнування під впливом міді та заліза [7], змінює їх валентність, попереджаючи утворення АФК при їх надлишку [8], пригнічення всмоктування ВМ у шлунково-

кишковому тракту [9]. За рахунок прямого контакту з еритроцитами, які допомагають транспортувати його по організму [10], реалізується прямий протективний ефект вітаміну Е на ФЕК (Рис. 4).

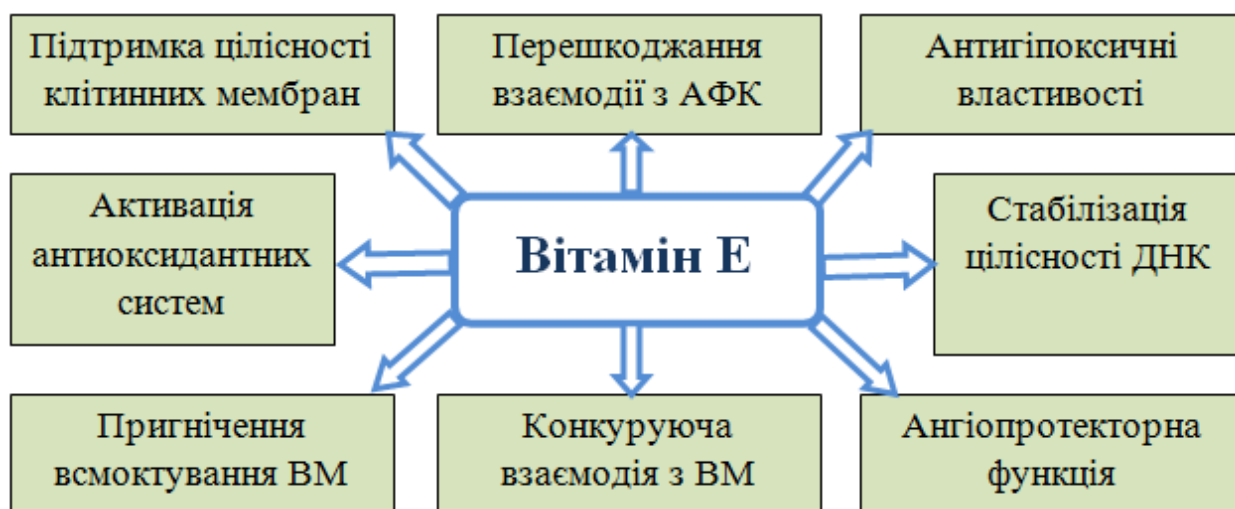


Рис. 4. Ефекти вітаміну Е, направлені на попередження негативного впливу надлишкового надходження ВМ у КМ.

Висновки.

За умов впливу важких металів відбувається пригнічення еритроцито-лейкоцитопоезу, синхронне зростання кількості мегакаріоцитів. Дані 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.

Використання вітаміну Е у якості коректора за рахунок своїх антагоністичних властивостей з важкими металами призводить до зменшення негативного їх впливу, що проявляється меншим накопиченням важких металів з кісткового мозку, попередженням значних відхилень у кількісному та якісному складі кровотворної.

Використана література.

1. Tavian M, Réault B. Embryonic development of the human hematopoietic system. *Int J Dev Biol.* 2005;49(2-3):243-50.

2. Hirschi KK. Hemogenic endothelium during development and beyond. *Blood*. 2012;119:4823-27.
3. Romaniuk A, Lyndina Yu, Sikora V, Lyndin M, Karpenko L, Gladchenko O. Structural features of bone marrow. *Interv Med Appl Sci*. 2016;8:121-6.
4. Cline JM, Maronpot RR. Variations in the histologic distribution of rat bone marrow cells with respect to age and anatomic site. *Toxicol Pathol*. 1985;13(4):349-55.
5. Grazuleviciene R, Nadisauskiene R, Buinauskiene J, Grazulevicius T. Effects of Elevated Levels of Manganese and Iron in Drinking Water on Birth Outcomes. *Polish J of Environ Stud*. 2009;18(5):819-25.
6. Romaniuk A, Sikora V, Lyndin M, Smiyanov V, Sikora V, Lyndina Yu, Piddubnyi A, Gyryavenko N, Korobchanska A. The features of morphological changes in the urinary bladder under combined effect of heavy metal salts. *Interv Med Appl Sci*. 2017 Jun;9(2):105-11. DOI: 10.1556/1646.9.2017.2.09.
7. Brigelius-Flohé R, Traber MG. Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J*. 1999;13(10):1145-55.
8. Trumbo PR. 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* 2005;135: 354-56.
9. Kim E-S, Noh SK, Koo SI. Marginal zinc deficiency lowers the lymphatic absorption of alpha tocopherol in rats. *J. Nutr*. 1998;128:265-70.
10. Niki E, Traber MG. A history of vitamin E. *Ann Nutr Metab*. 2012;61(3):207-12.

Дослідження протективних властивостей вітаміну Е на кістковий мозок щурів в умовах підвищеного споживання солей важких металів / Ю.М. Линдіна, В.В. Сікора, Н.І. Гирявенко та ін. // Вісник Вінницького національного медичного університету. - 2019. - 23(1). - С. 59-64.