

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ЛИНДІНА ЮЛІЯ МИКОЛАЇВНА

УДК 611.018.46+611.43.018]-092.9:613.63:615.356:577.161.3(043.3)

**МОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ КІСТКОВОГО МОЗКУ
ЗА УМОВ ВПЛИВУ СОЛЕЙ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ**

Спеціальність 14.03.01 – нормальна анатомія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Суми – 2020

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Сумському державному університеті МОН України.

Науковий керівник – доктор медичних наук, професор
Романюк Анатолій Миколайович,
Сумський державний університет МОН України,
завідувач кафедри патологічної анатомії.

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор
Кривецький Віктор Васильович,
Вищий державний навчальний заклад України
«Буковинський державний медичний
університет» МОЗ України (м. Чернівці),
завідувач кафедри анатомії людини ім. М. Г. Туркевича;

доктор медичних наук, професор
Старченко Іван Іванович,
Українська медична стоматологічна
академія МОЗ України (м. Полтава),
завідувач кафедри патологічної анатомії
з секційним курсом.

Захист відбудеться «14» 02 2020 року о 11⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої
вченої ради Д 55.051.05 при Сумському державному університеті
(40000, м. Суми, вул. Санаторна, 1).

Із дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Сумського державного
університету (40007, м. Суми, вул. Римського-Корсакова, 2).

Автореферат розісланий «11» 01 2020 року.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат медичних наук, доцент

О. С. Погорєлова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Кістковий мозок (КМ) – це найбільший гемопоетичний орган у ссавців. Він становить 3–5% від загальної маси тіла з постійною варіабельністю цього показника впродовж життя (Travlos G. S., 2006). Гемопоез у кістках починається ще у внутрішньоутробному періоді і триває впродовж онтогенезу (Tavian M., Réault B., 2005). Тому як ендогенні, так і екзогенні чинники можуть постійно впливати на якість процесу кровотворення, що відображається в порушенні гістоархітекtonіки КМ (Travlos G. S., 2006, Кривецький В. В., 2019).

За останні десятиріччя отримано значну кількість даних про кількісний та якісний склад КМ, які враховують топографію його розміщення та вік тварин (Travlos G. S., 2006). Але існує постійна потреба в уточненні одержаних результатів у зв'язку зі стрімким розвитком науки. Рутинні гістологічні методи дослідження не дозволяють повною мірою ідентифікувати всі складові КМ, що спонукає до використання інших (гістохімічних, імуногістохімічних) методик (Левицький Е. О., 2012).

У наш час значної актуальності набувають проблеми впливу екзогенних факторів на живі організми. Одними з найпотужніших поллютантів є солі важких металів (СВМ), концентрація яких у деяких регіонах України перевищує гранично допустимі концентрації у воді та ґрунті. На сьогодні з'ясовано, що більшість важких металів (ВМ) є життєво необхідними елементами, які потенціюють значну кількість реакцій в усіх живих організмах (Thirumoorthy N. et al., 2011; Sutherland D. E., Stillman M. J., 2011). Проте за умови їх надлишкового надходження або порушення їх метаболізму вони виявляють свої токсичні властивості, хоча більшість з них є есенціальними мікроелементами (МЕ). Вплив патогенних чинників, якими є й СВМ, на процес кровотворення може відбуватися шляхом їх прямої дії на КМ або опосередковано, через ушкодження інших внутрішніх органів (Jaishankar M. et al., 2014). Свій негативний ефект вони реалізують шляхом індукції перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) та утворення активних форм кисню (АФК), конкуруючого заміщення есенціальних МЕ, дезактивації ферментних систем, ушкодження ДНК тощо (Taylor M. P. et al., 2012). Всі ці процеси можуть відбуватися в гемопоетичній тканині, що позначається на показниках периферичної крові.

Незважаючи на досить з'ясований вплив зазначених факторів на більшість органів (Москаленко Р. А., 2010; Sikora V. et al., 2015), на жаль, мало досліджень присвячено вивченню впливу сполук ВМ на гемопоез. Більше того, наявні дослідження щодо цієї тематики здебільшого присвячені або крові, або КМ (Saljooghi A. S., Delavar-Mendi F., 2012) з вивченням гематотоксичного ефекту окремих поллютантів (Hounkpatin A. Y. et al., 2013).

Якісні та кількісні показники крові є віддзеркаленням функції системи гемопоезу та функціонування інших внутрішніх органів. Тому здебільшого морфологічні зміни в КМ (зміна архітекtonіки кровотворної тканини) швидко відображаються на показниках формених елементів крові (ФЕК). Саме комплексне дослідження системи гемопоез – кров дозволяє детально проаналізувати особливості негативної дії ксенобіотиків, ураховуючи можливість прямого їх впливу на клітини крові, які циркулюють у судинах (Сікора В. З., Приходько О. О., 2010).

Останнім часом усе більшу увагу приділяють вивченню змін у кровотворній тканині шляхом комплексного дослідження морфологічних особливостей КМ у зв'язку з можливістю одержання недостатньої інформації при цитологічному вивченні кровотворної тканини (Криволапов А. Ю., 2014). Це досягається завдяки виконанню трепанобіопсії клубової кістки та виготовленню гістологічних препаратів, на яких є можливість оцінювати не лише паренхіматозний компонент КМ (різні попередники гемопоезу), а й зміни з боку строми, що відіграє регульовальну роль у проліферації та дозріванні всіх ФЕК (Frenkel M. A. et al., 2007).

Іншим, не менш важливим, напрямом сучасної медицини є пошук ефективних коригувально-профілактичних засобів, які б сприяли підвищенню стійкості організму до умов постійно зростаючої урбанізації й технічного прогресу, що призводять до стрімкого забруднення довкілля. Враховуючи виражені прооксидантні властивості ВМ з одночасним ураженням ДНК, клітинних мембран, судин та інших складових більшості тканин, виправданим є використання вітаміну Е, що протидіє більшості цих ефектів (Traber M. G., 2006). При використанні цього коректора обов'язково ураховують його терапевтичну дозу для людини та видову належність тварин у зв'язку з доведеним протилежним ефектом вітаміну Е при його надлишковому надходженні до організму (Eder K. et al., 2002).

Гіпотетична можливість КМ накопичувати ВМ в умовах підвищеного їх надходження до організму спонукає до вивчення морфофункціональних особливостей гемопоезу та пошуку коректора в умовах мікроелементозу.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана відповідно до плану наукових досліджень Медичного інституту Сумського державного університету і є складовою частиною науково-дослідних тем кафедри патологічної анатомії № 0113U003315 «Морфогенез загальнопатологічних процесів» та № 0119U100887 «Сучасні погляди на морфогенез загальнопатологічних процесів». Тема дисертації затверджена вченою радою Сумського державного університету МОН України (протокол № 4 від 10.12.2015 року).

Метою дослідження стало вивчення морфофункціональних особливостей кісткового мозку статевозрілих щурів і хімічного складу гемопоетичної тканини стегнових кісток за дії на організм важких металів та обґрунтування можливості корекції їх пошкоджувальної дії вітаміном Е.

Для досягнення зазначеної мети визначені такі **завдання**:

1. Вивчити закономірності будови та елементного складу кісткового мозку інтактних щурів статевозрілого віку з метою подальшого проведення коректного порівняльного аналізу одержаних даних із результатами експерименту.

2. Визначити закономірності змін елементного складу кісткового мозку щурів за надмірного вживання солей важких металів.

3. Дослідити особливості коливань кількісних та якісних показників гемопоетичної тканини при підгострому й хронічному впливі солей важких металів.

4. Установити динаміку змін у загальному та біохімічному аналізах крові в умовах змодельованого мікроелементозу.

5. З'ясувати морфофункціональні особливості у системі гемопоез – кров та елементний склад кісткового мозку в період відновлення за умови відмінення полютантів із раціону піддослідних тварин.

6. Дослідити можливість корекції впливу важких металів на кістковий мозок та кров вітаміном Е у період споживання екзогенних ксенобіотиків та впродовж відновлення.

Об'єкт дослідження – кістковий мозок стегнових кісток лабораторних щурів.

Предмет дослідження – морфофункціональні особливості кісткового мозку за умов впливу на організм комбінації солей важких металів та корекції їх дії вітаміном Е.

Методи дослідження: мікроскопічне дослідження морфологічних змін кісткового мозку за допомогою гістологічних, гістохімічних та імуногістохімічних методик; морфометрія виявлених змін; атомно-абсорбційна спектрофотометрія гемопоетичної тканини; дослідження показників загального та біохімічного аналізу крові; статистичне оброблення цифрових даних.

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше встановлено, що додавання до раціону тварин комбінації солей заліза, міді, цинку, марганцю, свинцю та хрому за рахунок акумулювання їх у кістковому мозку призводить до пригнічення еритроцито- та гранулоцитопоезу за одночасного зростання кількості мегакаріоцитів. При цьому виникають значні коливання в якісному складі гемопоетичної тканини, що виявляються дистрофічно-некротичними та початковими диспластичними змінами в усіх його складових. Виявлено, що гематотоксичний ефект солей важких металів характеризується порушенням функціональної спроможності кровотворної тканини у вигляді коливання показників загального аналізу крові, які безпосередньо залежать від терміну споживання поллютантів та ступеня їх гематотоксичного впливу.

За допомогою використання комплексу сучасних методів (гістохімічних, імуногістохімічних, спектрофотометричних) встановлено особливості реадaptaційних можливостей кісткового мозку за умов припинення вживання солей важких металів. Виявлено виражені регенераторні можливості кровотворної тканини, які також залежать від терміну відновного періоду. З'ясовано, що навіть упродовж 90 діб після відмінення поллютантів не відбувається повного виведення важких металів з організму, що відбивається у відхиленнях від норми якісних та кількісних показників мієлоїдної тканини й крові.

Уперше за експериментальних умов вивчені протективні властивості вітаміну Е на кістковий мозок в умовах мікроелементозу. За рахунок додавання його у терапевтичних дозах до раціону щурів відбуваються зменшення морфологічних змін у кістковому мозку та крові упродовж вживання солей важких металів, а також прискорення регенераторних можливостей кровотворної тканини у період відновлення.

Комплексний аналіз одержаних результатів дозволив уточнити й доповнити дані про патогенетичні ланки негативної дії важких металів на процес кровотворення, що реалізується через прямий та опосередкований вплив екзогенних поллютантів на різні паростки гемопоезу. Виявлений чіткий зв'язок між гематотоксичним ефектом ксенобіотиків та функціонуванням системи гемопоезу – кров.

Практичне значення одержаних результатів. На підставі результатів експериментального дослідження виявлені структурні особливості КМ щурів та

з'ясовані ключові відмінності від гемопоетичної тканини людини як у нормі, так і упродовж споживання ксенобіотиків. Це може бути підґрунтям для подальших моделювань змін у кровотворній тканині під час вивчення впливу пошкоджувальних факторів. Виявлені результати детально демонструють особливості коливання показників кісткового мозку та крові упродовж споживання суміші солей важких металів. Установлені зміни чітко демонструють виражений гематотоксичний ефект ксенобіотиків за їх надлишкового надходження до організму.

Виявлені виражені відновні можливості кісткового мозку після припинення екзогенного впливу ксенобіотиків, які для досягнення більш оптимальних рівнів потребують додаткової корекції змін терапевтичними засобами. Таким профілактично-терапевтичним препаратом, що виявив гематопротекторні властивості упродовж експерименту, є вітамін Е. За рахунок своїх ангіопротекторних, антиоксидантних та інших властивостей він пригнічує негативну дію важких металів на кістковий мозок як упродовж їх уживання, так і в період відновлення. Тому вітамін Е рекомендований до вживання за умов підвищеного забруднення довкілля солями важких металів як упродовж перебування в екологічно-небезпечних середовищах, так і в період відновлення.

Виявлені особливості будови гемопоетичної тканини в інтактних тварин та щурів за умов впливу на організм солей важких металів та корекції виявлених змін можна використовувати під час вивчення відповідних розділів навчального матеріалу на теоретичних і практичних кафедрах із подальшим поширенням знань у практичну діяльність лікарів.

Одержані результати уточнюють дані про будову кісткового мозку й можуть бути основою для подальшого дослідження значної кількості питань у токсикології та гематології. Матеріали дисертаційного дослідження впроваджені в навчальний процес та наукову роботу на кафедрах морфології Сумського державного університету, анатомії людини Харківського національного медичного університету, оперативної хірургії з топографічною анатомією Тернопільського державного медичного університету ім. І. Я. Горбачевського, гістології, цитології та ембріології ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет», анатомії людини, оперативної хірургії та топографічної анатомії Запорізького державного медичного університету, анатомії людини; гістології Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова, анатомії, топографічної анатомії та оперативної хірургії; гістології, цитології та ембріології; анатомії людини ім. М. Г. Туркевича Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет», нормальної анатомії; оперативної хірургії з топографічною анатомією Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, анатомії людини Української медичної стоматологічної академії.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійною завершеною науковою працею. Здобувач здійснив інформаційний пошук, аналіз та інтерпретацію даних літературних джерел із проблемної тематики. Разом із науковим керівником було сформульовано мету та шість ключових завдань проведених досліджень. Дисертант виконала експериментальну частину дослідження та здійснила забір матеріалу для подальшого проведення комплексного вивчення. Автор самостійно провела гістологічні, гістохімічні та імуногістохімічні

дослідження, сумісно з працівниками Центру морфологічних досліджень Медичного інституту Сумського державного університету виконала спектрофотометричне вивчення елементного складу гемопоетичної тканини. Дисертант провела лабораторне дослідження крові, здійснила статистичне опрацювання та аналіз одержаних результатів. Здобувач написала всі розділи дисертаційної роботи. З науковим керівником провела узагальнення основних результатів, а також обговорила висновки та практичні рекомендації. У наукових працях здобувача, опублікованих одноосібно та в співавторстві, висвітлено основні результати, одержані під час виконання дисертаційної роботи.

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертаційної роботи представлені на науково-практичних конференціях і семінарах: конгресі анатомів, гістологів, ембріологів та топографоанатомів України «Актуальні питання анатомії, гістології, ембріології та топографічної анатомії» Запорізького державного медичного університету (Запоріжжя, 2015); Міжнародній науково-практичній конференції студентів та молодих вчених «Актуальні питання теоретичної та клінічної медицини» Сумського державного університету (Суми, 2015, 2016, 2017); Міжнародній науково-практичній конференції «Перспективні напрями наукових досліджень – 2015» (Братислава, 2015); III Міжнародній науково-практичній конференції «Природничі читання 2016» Буковинського державного медичного університету (Чернівці, 2016); III Всесвітній студентській конференції з біомедичних наук (Third global students' conference of biomedical sciences) медичного факультету Белградського університету (Белград, 2016); заочній науково-практичній конференції за міжнародної участі, присвяченій 150-річчю з дня народження професора М. Ф. Мельникова-Разведенкова «Сучасні аспекти морфології людини: успіхи, проблеми та перспективи» Харківського національного медичного університету (Харків, 2016); у матеріалах «Natural Science Readings» (Братислава, 2017); Всеукраїнській науково-методичній конференції, присвяченій 25-річчю Медичного інституту Сумського державного університету «Перспективи розвитку медичної науки і освіти» (Суми, 2017); науково-практичній конференції «Довкілля і здоров'я» ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України» (Тернопіль, 2017); XXII Міжнародному медичному конгресі студентів та молодих вчених ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України» (Тернопіль, 2018); науково-практичній конференції за міжнародної участі, присвяченій 60-річчю від дня народження професора Ю. Т. Ахтемійчука «Індивідуальна анатомічна мінливість органів та структур організму в онтогенезі» Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет» (Чернівці, 2018). Дисертаційну роботу заслухано на міжкафедральному семінарі Медичного інституту Сумського державного університету 19 червня 2019 року (протокол № 7).

Публікації. Матеріали дисертаційної роботи висвітлені у 20 працях, зокрема, 7 статтях, з яких 4 представлені у наукових фахових виданнях України, 2 – у закордонних журналах, що індексуються наукометричною базою Scopus, 13 тез опубліковано в матеріалах науково-практичних конференцій; 2 наукові праці опубліковано одноосібно.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 198

сторінках і складається з анотацій, вступу, розділів «Огляд літератури», «Матеріали та методи дослідження», «Результати власних досліджень (5 підрозділів)», «Аналіз та узагальнення результатів власних досліджень», висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел і додатків. Обсяг основного тексту – 146 с. Робота містить 56 рисунків, 12 таблиць та список цитованої літератури із 206 найменувань (48 кирилицею і 158 латиницею).

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ

Матеріали та методи дослідження. Дисертаційна робота виконана на кафедрах патологічної анатомії та морфології Медичного інституту Сумського державного університету. Вивчення особливостей будови КМ та показників крові проводили на 84 білих безпородних статевозрілих (4 місяці) щурах-самцях, ураховуючи відсутність значної варіабельності щодо будови гемопоетичної тканини в даного виду тварин у цьому періоді життя.

Піддослідні тварини перебували на стандартному раціоні харчування в приміщенні віварію Медичного інституту Сумського державного університету. Комісією з питань додержання біоетики Медичного інституту Сумського державного університету (протокол № 1/5 від 4 травня 2019 року) встановлено, що наукове дослідження відповідає вимогам світових рекомендацій із проведення експериментальних досліджень на тваринах.

Піддослідним тваринам давали розчинені у воді (при постійному вживанні) СВМ для вивчення морфофункціональних особливостей КМ за умов впливу їх комбінацій, концентрації яких були властиві північним районам Сумської області (з надлишковим умістом заліза, міді, цинку, хрому, марганцю та свинцю). Всі щури поділені на дві групи. До першої групи входили три серії лабораторних тварин (по 12 щурів у кожній): перша серія – контрольна серія (тварини вживали звичайну питну воду, якість якої відповідала санітарним нормам і правилам); друга – щури, які отримували водний розчин суміші СВМ: цинку ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) – 5 мг/л, міді ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) – 1 мг/л, заліза ($FeSO_4$) – 10 мг/л, марганцю ($MnSO_4 \cdot 5H_2O$) – 0,1 мг/л, свинцю ($Pb(NO_3)_2$) – 0,1 мг/л та хрому ($K_2Cr_2O_7$) – 0,1 мг/л); третя – щури, які отримували вищезазначену суміш солей на фоні корекції змін вітаміном Е. Дозу вітаміну Е для щурів розраховували за формулою Ю. Р. та Р. С. Рыболовлевих (Рыболовлев Ю. Р., Рыболовлев Р. С., 1979). У першій групі з метою вивчення підгострого та хронічного впливу СВМ на процес гемопоезу і кров тварин виводили з експерименту (шляхом декапітації під ефірним наркозом) на 30-ту та 90-ту доби (по 6 тварин із кожної серії).

До другої групи (процес відновлення) входили чотири серії лабораторних тварин: перша – контрольна серія; друга – щури, які вживали розчин суміші СВМ (90 діб), а потім переходили на звичайну питну воду; третя – тварини, які вживали розчин суміші СВМ (90 діб), а потім починали вживати звичайну питну воду з вітаміном Е, четверта – щури, які вживали розчин суміші СВМ на фоні корекції вітаміном Е (90 діб), а потім перейшли на звичайну питну воду та продовжували вживати вітамін Е. Процес швидкого та віддаленого відновлення вивчали шляхом виведення з експерименту по 6 тварин із кожної серії також на 30-ту (4-й місяць

експерименту) та 90-ту (6-й місяць експерименту) доби відновлення.

Вивчення особливостей будови КМ проводили на стегнових кістках щурів, які після видалення фіксували у 10 % забуференому розчині формаліну протягом 24 годин. Декальцинацію проводили у розчині ЕДТА (рН – 7,0) впродовж 14 діб за умови щоденної зміни розчину. Вилучення препаратів проводилося за наявності ознак остаточно завершеної декальцинації (оцінювали за допомогою голкового тесту). Морфологічному дослідженню підлягали всі частини стегнової кістки – епіфізи та діафіз. Загальну будову органа вивчали при забарвленні препаратів гематоксиліном та еозином. Якісний склад стромального компонента досліджували при фарбуванні препаратів за Ван-Гізоном та ШИК-реакцією (PAS-реакція).

Імуногістохімічне (ІГХ) дослідження проводили на зрізах (4×10^{-6} м) декальцинованої тканини стегнових кісток щурів. Реакція антиген-антитіло була візуалізована з використанням системи детекції «UltraVision Quanto Detection System HRP DAB Chromogen» («Thermo scientific», США), що включала блокування ендогенної активності пероксидази перекисем водню, блокування неспецифічного фонового забарвлення з використанням «Ultra V block», посилення реакції «Primary Antibody Amplifier Quanto» та кінцеву візуалізацію діамінобензидином (ДАБ) із дозбарвленням ядер гематоксиліном Маєра. У дослідженнях використана така панель антитіл («Thermo scientific», США): попередники мієлоцитопоезу були візуалізовані за допомогою поліклональних кролячих антитіл до мієлопероксидази (МПО), різні класи лімфоцитів були віддиференційовані за допомогою моноклональних кролячих антитіл до Т-лімфоцитів (CD3) та моноклональних кролячих антитіл до В-лімфоцитів (CD79 α), поліклональні кролячі антитіла до S100 протеїнів були використані для ідентифікації антиген-презентуючих макрофагів.

Препарати досліджували за допомогою мікроскопа «Carl Zeiss Primo Star» (Німеччина). Отримання та зберігання знімків проводили за допомогою цифрової камери «Zeiss AxioCam ERc 5s» (Німеччина) з цифровим виходом системи зображення «ZEN 2 (blue edition)» (Німеччина). Вимірювали розміри складових елементів мікропрепаратів у середовищі морфометричної програми «Digimizer» 3.0.5.0. Визначали середні значення співвідношення паренхіми до строми, площі кожного з його компонентів.

Частина стегнових кісток щурів використана для визначення елементного вмісту в тканині КМ. Атомно-абсорбційна спектрофотометрія виконана в лабораторії атомно-абсорбційного аналізу Центру морфологічних досліджень Сумського державного університету з метою встановлення вмісту ВМ в 1 мг досліджуваної тканини. Для отримання матеріалу ми проводили виділення стегнового фрагмента в його середній частині. Після цього виштовхували вміст кістково-мозкової порожнини за допомогою бужувальних засобів. Отримана при цьому тканина підлягала подальшим дослідженням. Проведення вимірів та розрахунків проводили з використанням програми AAS-SPECTR на комп'ютері.

Для встановлення функціонального стану КМ щурів ми провели визначення показників загального аналізу крові на автоматичному гематологічному аналізаторі PSE-210 (Японія): кількість еритроцитів, лейкоцитів, тромбоцитів, гемоглобіну (Hb), швидкість осідання еритроцитів. Матеріалом для дослідження цих параметрів була кров, отримана з аорти щурів під час виведення їх з експерименту. З метою

виявлення впливу ВМ на біохімічні показники крові ми визначили в крові кількість кальцію, натрію, калію, креатиніну та сечовини. Біохімічні показники крові визначали в сироватці крові на автоматичному аналізаторі "Cormay plus".

Оброблення даних здійснювали прикладними статистичними методами, що використовуються в медицині, за допомогою програми Microsoft Excel 2010 із додатком AtteStat 12.0.5. Обчислювали середню арифметичну (M) і стандартне відхилення (SD), зазначаючи відсоток коливання параметрів між досліджуваними групами. Першочергово вибірки перевіряли на нормальність. Нормальними вважали ті показники, в яких значення χ^2 (критерій Пірсона) менше від значення χ^2 критичного (згідно з таблицею критеріїв Пірсона). Оцінювання ймовірності розбіжностей порівнюваних показників проводили з використанням t-критерію Стюдента (t), урахувавши наявність нормального розподілу вибірок під час вивчення різних гематологічних, мікроелементних та гістологічних характеристик досліджуваних параметрів. Взаємозв'язок між досліджуваними показниками оцінювали згідно з критерієм кореляції Пірсона (r). Результати вважали статистично достовірними за ступеня ймовірності вірогідності більше ніж 95 % ($p < 0,05$).

Результати досліджень та їх обговорення. Оцінюючи результати проведених досліджень, можна стверджувати, що для КМ піддослідних тварин характерний стромально-паренхіматозний тип будови. Гемопоетична тканина наявна в усіх відділах стегнової кістки – кістково-мозковому каналі діафіза та міжтрабекулярному просторі губчастої кістки епіфізів. Для епіфізів характерне переважання строми (в середньому 79,1 %), для діафіза – гемопоетичної тканини (69,6 %). Стромальний компонент КМ представлений кістковою тканиною ($48,8 \pm 3,3$ % на рівні епіфізів), сіткою кровоносних судин ($18,7 \pm 2,1$ %), жировою ($11,0 \pm 2$ %) та фіброзною ($0,7 \pm 0,2$ %) тканинами, в яких дифузно розсіяні макрофаги і мастоцити, сіткою ретикулярних волокон. Гістологічне та гістохімічне дослідження дозволили виявити впорядкованість розміщення всіх компонентів строми – складну тривимірну структуру кісткових балок у ділянці епіфізів, відцентрованість спрямування кровоносних судин у напрямку до ендоста на рівні діафіза, прицентровість локалізації ліпоцитів із тенденцією до згруповування в епіфізах та розміщення одним безперервним шаром на поверхні трабекул.

Гемопоетична тканина (паренхіма КМ) займає $20,9 \pm 3,7$ % на рівні епіфізів стегнової кістки та $69,6 \pm 2,2$ % – на рівні діафіза, серед яких на гранулоцитопоез відводиться $74,2 \pm 4,7$ %, на еритроцитопоез – $24,3 \pm 4,7$ %, на лімфоцитопоез – не більше ніж 5,0 %. Мегакаріоцити займають 0,1–0,3 % площі кровотворення. Попередники гранулоцитів, які на рівні епіфізів займають у середньому $14,8 \pm 1,4$ %, а на рівні діафіза – $51,2 \pm 3,3$ %, здебільшого розміщуються в ендостальних ділянках епіфізів та навколо синусоїдів діафіза. У клітинах, що перебувають на нижчій сходинці диференціювання (мієлобласти, промієлоцити), спостерігається більш інтенсивна ІГХ реакція при виявленні рецепторів МПО.

Еритроцитарний паросток представлений острівцями, розміщеними більш центрально та біля капілярів (займає в середньому $5,3 \pm 1,4$ % на рівні епіфізів та $17,8 \pm 3,3$ % – на рівні діафіза). Усі представники еритроїдного диферона знаходяться навколо центрально-розміщеного макрофага (S100-позитивні клітини). Наявна тенденція до більш наближеної локалізації менш диференційованих форм

еритроцитопоезу щодо макрофага. Із зростанням диференціювання клітин як для еритроцитопоезу, так і для гранулоцитопоезу характерні поступове зменшення їх розмірів, конденсація хроматину в ядрі, зміна форми ядра, накопичення гемоглобіну (для попередників еритроцитів) та гранулярної зернистості (для попередників гранулоцитів). М:Е-співвідношення дорівнює 2:1–5:1.

Попередники лімфоцитів (CD3 та CD79α) характеризувалися розсіяним типом розміщення з поодинокими випадками згруповування і відносно сталою їх кількістю (не перевищували 5,0 %). Мегакаріоцити виявляються поодиночі, групами та кластерами чітко біля синусоїдів з явищами клазматозу в просвіт кровоносних судин.

Порівнюючи кількісні та якісні показники червоного КМ щурів та людини, значних відмінностей не було виявлено (Левицкий Э. О., 2012), хоча клітинам гемопоезу щурів властиві певні особливості. У більшості еозинофілів, юних та паличкоядерних нейтрофілів наявні кільцеподібні ядра, зернистість нейтрофільних гранулоцитів дуже дрібна, їх ядра більш сегментовані (5–8 сегментів), в дещо меншій кількості спостерігаються лімфоцити, мегакаріоцити мають згрупований тип розміщення, утворюючи групи і кластери.

З метою визначення функціонального стану КМ у статевозрілих щурів-самців ми дослідили кількісні показники крові – коливання ФЕК могло бути індикатором кровотворної спроможності гемопоетичної тканини. Додатково ми провели визначення деяких біохімічних параметрів крові – Са, Na, К, креатиніну та сечовини. Вони побічно свідчили про загальний вплив ВМ на організм тварин, що опосередковано могло відбитися на гемопоезі. В інтактних тварин кількість Нв в середньому становила $142,08 \pm 2,13$ г/л, еритроцитів – $4,42 \pm 0,21 \times 10^{12}/л$, лейкоцитів – $8,16 \pm 0,29 \times 10^9/л$ та тромбоцитів $256,8 \pm 4,52 \times 10^9/л$. ШОЕ коливалася від 1 до 3 мм/годину. Виявлено відносно стабільні показники Са (в середньому становив 3,02 ммоль/л) Na (135,23 ммоль/л), К (4,68 ммоль/л), креатиніну (78,79 мкмоль/л) та сечовини (4,86 ммоль/л).

Атомно-абсорбційна спектрофотометрія дозволила встановити вміст Fe, Cu, Zn, Mn, P1 та Cr у КМ. Гемопоетична тканина характеризувалася варіабельним вмістом різних ВМ зі значним переважанням заліза (в середньому 516,32 мкг/г), міді (в середньому 15,15 мкг/г) та цинку (в середньому 58,72 мкг/г) при відносно низьких показниках марганцю (в середньому 3,3 мкг/г), хрому (в середньому 1,9 мкг/г) та свинцю (в середньому 0,63 мкг/г). Загальна кількість ВМ у гемопоетичній тканині у середньому становила 596,1 мкг/г.

Проведене експериментальне дослідження з додаванням до водного раціону щурів СВМ (тварини 2-ї серії 1-ї групи) виявило значні коливання кількості ВМ у КМ (рис. 1 А). Спостерігалось стрімке накопичення Fe, Cu, Zn, Cr, Mn та Pb з пролонгацією дослідження. Найбільше зростала кількість заліза, хрому та свинцю, за умови найнижчого накопичення цинку. При пролонгації експерименту відбувалося зростання накопичення поллютантів, але темпи цього акумулювання ставали менш вираженими. Так, упродовж 90 діб відбулося зростання кількості Fe на 147,0 %, Cu – на 130,6 %, Zn – на 59,4 %, Mn – на 105,0 %, Cr – на 134,7 % та Pb – на 182,0 % ($p < 0,001$). Загальна кількість ВМ зросла на 137,5 % ($p < 0,001$) щодо контролю.

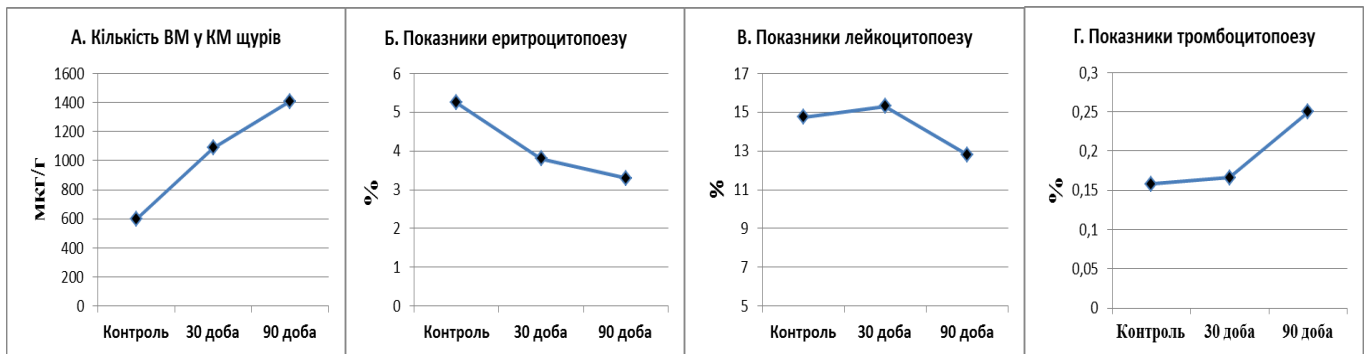


Рисунок 1 – Зміни щодо накопичення ВМ (А) у КМ щурів 2-ї серії 1-ї групи та особливості коливання при цьому різних паростків гемопоезу (Б,В,Г)

Накопичення ВМ у гемопоетичній тканині відобразилося на кровотворенні (рис. 1 Б, В, Г). У КМ спостерігався стрімкий розвиток мікроелементозу (зміна якісних та кількісних показників усіх паростків гемопоезу та оточуючих тканин). При пролонгації впливу екзогенних полютантів відбувалися пригнічення еритроцито- та лейкоцитопоезу, синхронне зростання кількості мегакаріоцитів. Такі зміни мали тенденцію до наростання за пролонгації експерименту і досягали значних рівнів відхилення на 90 добу спостереження – площа еритроцитопоезу знизилася на 36,6 % ($p = 0,003$) на рівні епіфізів та на 19,7 % ($p = 0,013$) – на рівні діафіза, площа гранулоцитопоезу зменшилася на 13,0 % ($p = 0,005$) та 14,3 % ($p < 0,001$) відповідно, тромбоцитопоез зріс на 40,0 % ($p < 0,001$). Короткочасне зростання гранулоцитопоезу (30-та доба) пояснюється активацією прозапальних механізмів як у КМ, так і в інших органах.

Як виявилось, найбільш чутливою складовою КМ є еритропоетична тканина, що проявляється анемією, яка стрімко виникає та може як стимулювати, так і посилювати спровокований важкими металами тромбоцитоз. Зменшення кровотворної тканини більш виражене в ділянці епіфізів, хоча в людей гематотоксичний ефект більш виражений у діафізі з тенденцією до поширення у напрямку епіфізів. У зв'язку із синхронними змінами (зниженням) як площі еритроцитопоезу, так і гранулоцитопоезу відхилень значень М:Е-співвідношення у КМ щурів в усіх термінах дії СВМ не спостерігалось.

Поряд із кількісними змінами КМ у щурів виникали та в міру пролонгації експерименту наростали й якісні зміни – явища апоптозу та некрозу клітин, макрофагальна інфільтрація, міксоматоз, крововиливи, ектазія судин, набряк, ліпоматоз, диспластичні зміни в усіх паростках гемопоезу, порушення стратифікації розміщення клітин еритрона та попередників гранулоцитів, зміни архітектоники кісткових балок та інші.

Зміни в системі лімфоцитопоезу не мали статистично-достовірних відмінностей, що може бути пов'язано з відсутністю впливу ВМ на їх утворення в КМ.

Оскільки КМ є основним органом кровотворення, то коливання в його показниках відбилося на рівнях ФЕК. Гематотоксичний ефект ВМ призвів до зниження кількості еритроцитів через 3 місяці на 32,5 %, Нв – на 18,4 %, лейкоцитів – на 15,3 %, а кількість тромбоцитів зросла на 11,0 % ($p < 0,001$) (рис. 2 А). Наявність сильного кореляційного зв'язку ($p < 0,001$) свідчить про синхронність

порушень у системі гемопоез – кров. У процесі надходження СВМ до організму відбуваються значні зміни і в БАК (рис. 2 Б), що виявляються зростанням кількості Na, креатиніну та сечовини з одночасним зменшенням кількості Ca і К.

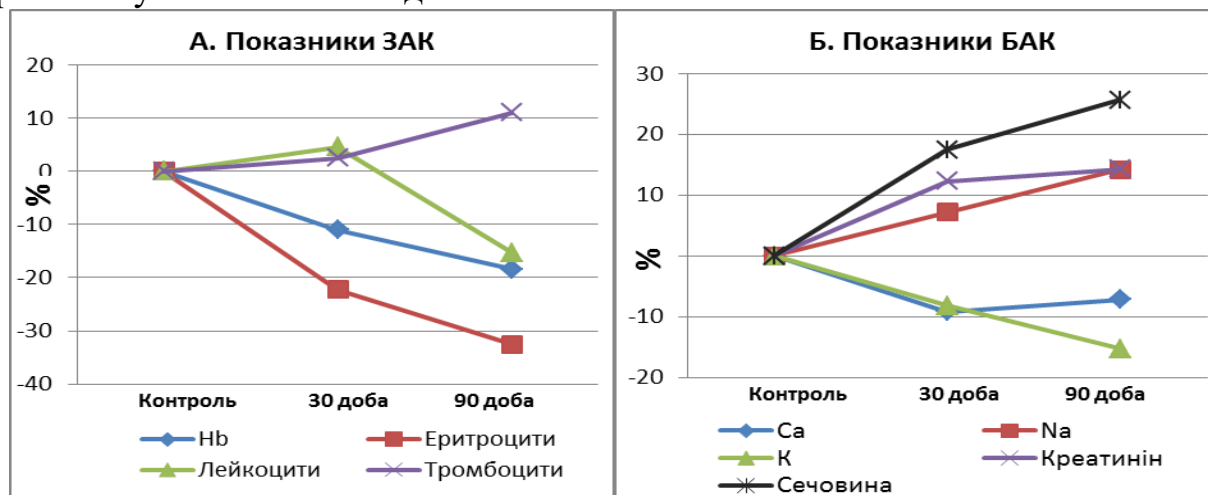


Рисунок 2 – Показники ЗАК (А) та БАК (Б) у щурів 2-ї серії 1-ї групи

Після припинення додавання СВМ до води (тварини 2-ї серії другої групи) у щурів поступово зменшувалися зміни в досліджуваних показниках гемопоетичної тканини. У процесі відновлення спостерігалися виведення ВМ із КМ (найбільш повільно виводилися свинець і хром), зростання площі еритроцито- та лейкоцитопоезу, зменшення кількості мегакаріоцитів, зникали дистрофічні й диспластичні зміни в складі паренхіми і строми, поступово відновлювалися показники ЗАК та БАК.

Синхронність вищезазначених змін, супроводжуваних сильними кореляційними зв'язками між цими параметрами ($p < 0,001$), дозволяє з високою ймовірністю стверджувати про тісні взаємозв'язки між накопиченням ВМ, гематотоксичним ефектом цих полютантів та пригніченням функції КМ (зниження ФЕК). Хоча й спостерігалось значне покращання всіх показників, їх значення навіть на 90-ту добу відновлення значно відрізнялися від результатів інтактної групи тварин.

Проведене дослідження демонструє більш виражені зміни в системі гемопоез – кров саме під час підгострого терміну експерименту (30 діб) з поступовим їх сповільненням на 90-ту добу, що пов'язано з активацією ендогенних адаптаційно-компенсаторних процесів у щурів за зміни умов існування.

Зазначені зміни пов'язані з прямою та опосередкованою гематотоксичною дією ВМ (рис. 3). Безпосередньо впливаючи на функціонування гемопоетичних клітин (посилення ПОЛ та утворення АФК) (Jaishankar M. et al., 2014), пригнічення антиоксидантних систем (Wadhwa N. et al., 2012), дестабілізація ДНК (Romaniuk A. et al., 2015), деактивація ферментних систем, ВМ пригнічують проліферативну активність клітин та блокують їх дозрівання, підвищують проникність судинної стінки (Finney L., 2009). Накопичуючись у складі паренхіматозного компонента КМ (Taylor M. P. et al., 2012), вони попереджають повне виведення їх з організму та пролонгують свій хронічний гематотоксичний ефект.

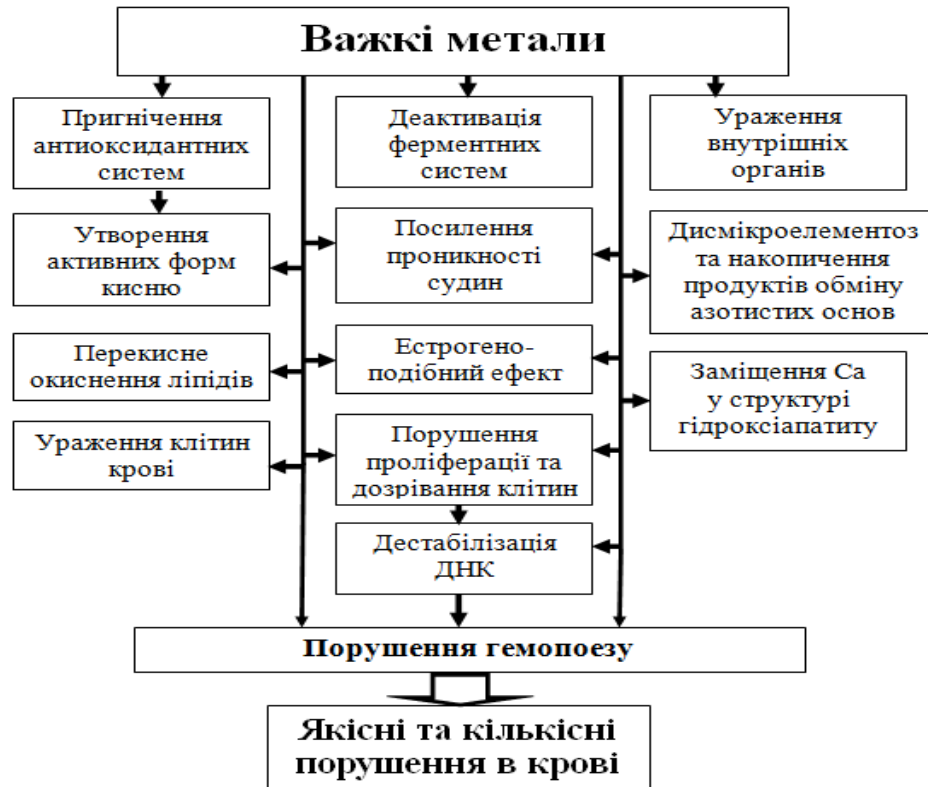


Рисунок 3 – Схема негативного впливу ВМ на гемопоєз

Значне місце в пригніченні гемопоєзу відіграє й естрогеноподібна активність ВМ (Jackson L. W., et al., 2011). При зростанні кількості ВМ у крові посилюється їх естрогеноподібна дія на КМ, враховуючи наявність рецепторів до естрогену у клітинах гемопоєзу (Schulze H. et al., 2005). Ми не виключаємо пряму цитотоксичну дію металів і на самі ФЕК (Saljooghi A. S., Delavar-Mendi F., 2012). Реактивний тромбоцитоз також пов'язаний із поступово прогресуючою анемією, у результаті чого зростає швидкість дозрівання попередників тромбоцитів та знижується їх руйнування (Jaishankar M. et al., 2014).

За умови використання коректора (вітаміну Е) у КМ та крові зміни мали менш виразний характер. Так, у тварин (щури 3-ї серії 1-ї групи), що впродовж 90 діб споживали СВМ разом із терапевтичною дозою коректора (9,1 мг/кг), спостерігалось менш стрімке накопичення ВМ у гемопоетичній тканині. Через 90 діб загальна їх кількість перевищувала показники контролю на 74,3 % ($p < 0,001$), при цьому кількість Fe зросла на 80,3 %, Cu – на 91,8 %, Zn – на 44,4 %, Mn – на 79,9 %, Cr – на 108,5 % та Pb – на 122 % ($p < 0,001$). Як і у випадку з вживанням СВМ, у тварин 3-ї серії 1-ї групи виявлена тенденція до більш стрімкого накопичення ВМ упродовж перших 30 діб із значно більшим зростанням кількості хрому та свинцю за умови найнижчого накопичення цинку.

У тварин, які після вживання СВМ почали отримувати вітамін Е (щури 3-ї серії 2-ї групи), спостерігалось більш стрімке виведення ВМ із КМ порівнянно із щурами 2-ї серії 2-ї групи. На 90-ту добу відновлення їх сумарна кількість знизилася на 47,4 % ($p < 0,001$), але не досягала показників контрольної групи тварин, на 24,4 % ($p < 0,001$) перевищуючи їх значення. Зовсім іншою була ситуація у щурів, які весь час отримували вітамін Е (4-та серія 2-ї групи). У них на фоні значно

нижчих показників акумулювання ВМ у КМ впродовж відновного періоду спостерігалось майже повне виведення ксенобіотиків із гемопоетичної тканини. Але це стосувалося більшою мірою лише Fe та Zn. Щодо Cr та Pb, то навіть за умови їх зменшення у КМ показники тварин 4-ї серії 2-ї групи через 3 місяці спостереження після відмінення СВМ перевищували показники інтактних тварин на 35,8 та 37,2 % ($p < 0,001$) відповідно.

Аналізуючи вищезазначене, можна стверджувати, що додавання вітаміну Е до раціону щурів сприяло меншому накопиченню та більш швидкому виведенню ВМ із гемопоетичної тканини. Незважаючи на використання коректора, рівні металів не досягають показників контролю, навіть на 90-ту добу після припинення споживання СВМ, хоча у разі постійного отримання вітаміну Е упродовж експерименту та відновного періоду максимально наближуються до значень контрольної серії тварин. Дещо нівелюється ефект коректора на 90-ту добу відновлення, що пов'язано з припиненням негативної дії екзогенних поллютантів (майже повне виведення їх із гемопоетичної тканини).

Використання вітаміну Е як коректора відобразилося на кількісних та якісних показниках КМ. Так, у тварин 3-ї серії 1-ї групи спостерігалися значно нижчі показники пригнічення кровотворення, порівняно зі щурами, що виключно вживали СВМ. На 90 добу експерименту відбувалося зниження еритроцитопоезу на 30,0 % ($p = 0,095$) на рівні епіфізів та на 17,8 % ($p = 0,019$) на рівні діафізу, гранулоцитопоез був пригнічений на 6,1 % ($p = 0,047$) та 13,7 % ($p < 0,001$) відповідно, кількість мегакаріоцитів зросла на 25 % ($p = 0,035$). Серед якісних змін незначною мірою спостерігалися ектазія синусоїдів, крововиливи, явища еозинофілії, зменшення розмірів еритроїдних островців, порушення тинкторіальних (сприйняття гематоксиліну, еозину, інтенсивність забарвлення мієлопероксидазою) властивостей різних предикторів, порушення закономірностей розміщення попередників гранулоцитів (їх ендостального розміщення) та еритроцитів (їх островковість та компактність), незначна макрофагальна інфільтрація.

Упродовж відновного періоду використання вітаміну Е призводило до більш стрімкого та майже повного відновлення усіх паростків кровотворення. У щурів 4-ї серії 2-ї групи через 90 діб відновного періоду відбулося зростання площі еритроцитопоезу на рівні епіфізів на 29,5 та 18,5 % на рівні діафіза, гранулоцитопоезу – на 5,8 та 11,4 % відповідно. Кількість мегакаріоцитів зменшилася на 23,0 %.

У тварин, яким після споживання СВМ почали додавати до раціону вітамін Е у відновний період (3-тя серія 2-ї групи), динаміка покращання кровотворення порівняно зі щурами 2-ї серії 2-ї групи мала більш виразний характер. Площа еритроцитопоезу зросла на 8 % більше, ніж у тварин без додавання коректора. Більш стрімко зникали і якісні порушення у кровотворній тканині, які майже повністю були відсутні на 90-ту добу відновлення. Лише в окремих ділянках зберігалися явища ліпоматозу та переповнені кров'ю синусоїди. Наявність мегакаріоцитів з явищами емперіоплезу свідчило про підвищення темпів регенераторного процесу, що неодноразово було помічено під час додавання факторів росту до гемопоетичної тканини (Rastogi V. et al., 2014).

Використання коректора та зміна якісного й кількісного складу КМ

прямопропорційно відобразилися на показниках периферичної крові. Упродовж експерименту коливання Нв, еритроцитів, лейкоцитів та тромбоцитів при споживанні вітаміну Е були менш помітними (шури 2-ї серії 2-ї групи), що призвело до зниження Нв лише на 6,6 %, еритроцитів – 23,3 %, лейкоцитів – 13,2 %, зростання тромбоцитів – на 8,2 % ($p < 0,001$). У відновний період використання вітаміну Е було підґрунтям для стрімкого відновлення показників ЗАК, які значно наблизилися до значень контрольної серії тварин.

Показники змін БАК мали подібну тенденцію до порушення з поступовим зменшенням негативних проявів у період відновлення. Відбувалося поступове відновлення рівнів Са, Na, К, сечовини та креатиніну, які досягали найбільш оптимальних значень через 3 місяці відновного періоду. Швидкість та повнота їх відновлення також значно покращувалися за умови додавання коректора.

Отже, використання вітаміну Е призводить до зменшення накопичення ВМ у гемопоетичній тканині, більш стрімкого виведення та зменшення їх пагубного впливу на систему гемопоез – кров. Зазначені ефекти реалізуються через можливу підтримку цілісності клітинних мембран, перешкоджання взаємодії з вільними радикалами і пероксидами жирних кислот, які утворюються за надлишкових концентрацій ВМ у складі клітин (Traber M. G., 2006). Проявляючи свої виразні антигіпоксичні властивості за рахунок стабілізування мітохондріальних мембран та участі у синтезі убіхінону, він потенціює клітинні антиоксидантні механізми захисту (Buettner G. R., 2011). Впливаючи на ДНК, він стабілізує цілісність генетичного матеріалу, що є доволі актуальним питанням у стрімко проліферувальній тканині, якою, без сумніву, є КМ. За рахунок своєї ангіопротекторної функції вітамін Е підтримує цілісність судинних стінок та їх проникність, що намагаються порушити підвищені концентрації ВМ у крові (рис. 4).

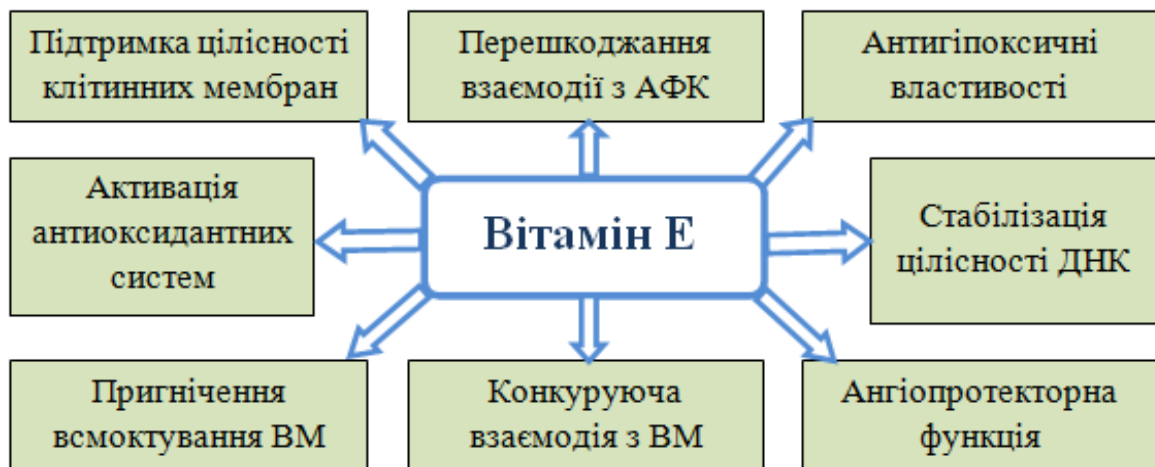


Рисунок 4 – Ефекти вітаміну Е, спрямовані на попередження негативного впливу надлишкового надходження ВМ до КМ

Використання вітаміну Е як коректора призводить до прямого конкуруючого ефекту з деякими ВМ – його окиснювальне руйнування під впливом міді та заліза. За рахунок прямого контакту з еритроцитами, які допомагають транспортувати його організмом (Niki E., Traber M. G., 2012), реалізується прямий протективний ефект вітаміну Е на ФЕК.

Статистичний аналіз одержаних показників демонструє значне пригнічення

гемопоезу та зниження кількості ФЕК у периферичній крові при накопиченні ВМ у КМ. При цьому ми виявили, що найбільше впливають на варіабельність зазначених показників хром та свинець, які мають виражені прооксидантні властивості за надлишкового надходження до організму (Jaishankar M. et al., 2014). Наявність кореляційних зв'язків між різними металами та показниками КМ і крові свідчить про можливість кожного окремого ВМ ізольовано впливати на різні паростки кровотворення.

Наявність прямих сильних взаємозв'язків між площею еритроцитопоезу і рівнем Hb та еритроцитів у крові, гранулоцитопоезом та кількістю лейкоцитів, тромбоцитопоезом і рівнем тромбоцитів підтверджує дані про тісні зв'язки між зазначеними параметрами, а також пряму залежність функціональної спроможності КМ від якісного та кількісного складу гемопоетичної тканини.

Аналізуючи всі одержані результати можна з високою ймовірністю стверджувати, що надходження СВМ у підвищеній кількості до організму статевозрілих щурів призводить до зростання їх вмісту в КМ, що проявляється різностороннім ураженням гемопоетичної тканини. Наслідки гематотоксичного ефекту поллютантів прямо відображені в периферичній крові у вигляді варіабельності кількості Hb, еритроцитів, лейкоцитів та тромбоцитів. За умов відмінення вживання ксенобіотиків відбувається оптимізація усіх параметрів упродовж 90 днів, хоча вони все ще залишаються відмінними від результатів контрольної групи тварин. Використання вітаміну Е як коректора частково нівелює негативний ефект ВМ за рахунок різностороннього конкуруючого ефекту з ними, призводячи до менш виразних ефектів при їх одночасному споживанні, більш повного та швидкого покращання у відновному періоді. Відхилення, що виникають упродовж експерименту, у жодному разі не досягають нормальних показників під час відновлення, підкреслюючи кумулятивні властивості екзогенних поллютантів.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведене теоретичне узагальнення і нове вирішення наукового завдання, що стосується морфофункціональних особливостей кісткового мозку стегнових кісток статевозрілих щурів за умов підвищеного надходження до організму солей важких металів та корекції виявлених змін вітаміном Е, з'ясування патогенетичних особливостей їх гематотоксичного впливу як у період споживання екзогенних поллютантів, так і впродовж відновлення, що дозволило зробити такі висновки:

1. Кістковий мозок статевозрілих щурів побудований із стромы, яка складається із кісткової, жирової, фіброзної тканин, кровоносних судин, мастоцитів, тощо, та паренхіми, що представлена різними попередниками еритроцито-, лейкоцито- та тромбоцитопоезу. Всі складові гемопоетичної тканини мають чіткі особливості розташування у середині стегнових кісток. Серед загального об'єму кровотворної тканини стромальний компонент на рівні епіфізів займає $79,1 \pm 3,7$ %, на рівні діафізів – $30,4 \pm 2,2$ %. Гемопоетична тканина на рівні епіфізів становить $20,9 \pm 3,7$ %, на рівні діафізів – $69,6 \pm 2,2$ %. Мієлоїдно:еритроїдне співвідношення перебуває на рівні 2:1–5:1. Загальна кількість важких металів у гемопоетичній тканині у середньому становить $596,1 \pm 21,9$ мкг/г.

2. За умови споживання солей важких металів спостерігалось стрімке накопичення важких металів у кістковому мозку (впродовж першого місяця). В міру пролонгації експерименту відбувалося зростання вмісту хімічних елементів, однак темпи цього акумулювання ставали менш вираженими. Упродовж 90 діб відбувалося зростання кількості Fe на 147,0 %, Cu – на 130,6 %, Zn – на 59,4 %, Mn – на 105,0 %, Cr – на 134,7 % та Pb – на 182,0 % ($p < 0,001$). Загальна кількість важких металів зростала на 137,5 % ($p < 0,001$).

3. За умов впливу важких металів відбувалося пригнічення еритроцито- та лейкоцитопоезу, синхронне зростання кількості мегакаріоцитів. Зміни мали тенденцію до наростання за пролонгації експерименту і досягали максимальних рівнів відхилення на 90-ту добу спостереження – площа еритроцитопоезу знижувалася на 36,6 % на рівні епіфізів та на 19,7 % на рівні діафізу, площа гранулоцитопоезу зменшувалася на 13,0 та 14,3 % відповідно, тромбоцитопоез зростав на 40 % ($p < 0,001$). На фоні мікроелементозу виникали та прогресували якісні зміни: явища апоптозу та некрозу клітин, макрофагальна інфільтрація, міксоматоз, крововиливи, ектазія судин, набряк, ліпоматоз, диспластичні зміни в усіх паростках гемопоезу.

4. Гематотоксичний ефект важких металів у периферійній крові призводив до зниження кількості еритроцитів на 32,5 %, гемоглобіну – на 18,4 %, лейкоцитів – на 15,3 %, кількість тромбоцитів зростала на 11,0 % ($p < 0,01$). Наявність сильного кореляційного зв'язку ($p < 0,001$) у системі гемопоез – кров свідчить про синхронність порушень. Під час вживання полютантів відбувалося зростання кількості Na, креатиніну та сечовини з одночасним зменшенням Ca та K ($p < 0,05$).

5. За умов відновлення відбувалося поступове зменшення виразності усіх вищезазначених змін, які прямо залежали від терміну відновного періоду ($p < 0,05$). Спостерігалось виведення важких металів із кісткового мозку (зменшення на 40,8 %), зростання площі еритроцито- (на 32,8 % на рівні епіфізів та 18,3 % на рівні діафізу) та лейкоцитопоезу (на 9,7 % на рівні епіфізів та 8,4 % на рівні діафізу), зменшення кількості мегакаріоцитів (на 25 %), зникали дистрофічні та диспластичні зміни у складі паренхіми та строми, поступово відновлювалися показники крові.

6. Використання вітаміну E як коректора призводило до зменшення негативного впливу солей важких металів на гемопоез, що проявлялося меншим накопиченням та більш стрімким їх виведенням із кісткового мозку, попередженням значних відхилень у кількісному та якісному складі кровотворної тканини та прискоренням їх відновлення і, як наслідок, меншою варіабельністю показників периферичної крові.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. У зв'язку з подібними структурними особливостями кісткового мозку статевозрілих щурів та людини (за умови незначних видових характеристик) пропонується використовувати вивчення впливу інших шкідливих факторів та фармакологічних препаратів на цих тваринах для визначення морфофункціональних змін у системі гемопоез – кров за умов змодельованого експериментального дослідження.

2. Ураховуючи виразні гематопротективні властивості вітаміну Е за умов мікроелементозу, пропонується його застосування у разі потрапляння організму в умови підвищеного забруднення довкілля солями важких металів та впродовж відновного періоду.

3. Особливості системи гемопоез – кров в інтактних та експериментальних щурів за умов впливу на організм солей важких металів та корекції цих змін, які ми виявили, можна використовувати під час вивчення відповідних розділів навчального матеріалу на кафедрах нормальної анатомії, гістології, патологічної анатомії, гігієни з екологією, з подальшим поширенням знань у практичну діяльність лікарів.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Романюк АМ, Гринцова НБ, Коробчанська АБ, Сауляк СВ, Линдіна ЮМ. Морфологічні зміни у кістковій системі та внутрішніх органах за умови впливу на організм солей важких металів. Актуальні питання медичної науки і практики. 2015;82(2):155–160. *(Здобувач провела експериментальне дослідження, опрацювала одержані результати дослідження, сформулювала висновки).*

2. Romaniuk A, Lyndina Yu, Sikora V, Lyndin M, Karpenko L, Gladchenko O, Masalitin I. Structural features of bone marrow. Interv Med Appl Sci. 2016;9(2):105–11. DOI: 10.1556/1646.8.2016.3.3 *(Дисертант провела експериментальне дослідження, виконала гістологічне та імуногістохімічне вивчення препаратів, опрацювала результати дослідження, сформулювала висновки).*

3. Романюк АМ, Сікора ВВ, Линдіна ЮМ, Линдін МС. Поширеність важких металів у навколишньому середовищі та їх роль у життєдіяльності організму. Буковинський медичний вісник. 2017;21(82),ч.1:145–50. DOI: 10.24061/2413-0737/XXI.2.82.1.2017.32. *(Автор провела огляд та детальний аналіз літературних джерел, підготувала статтю до друку).*

4. Romaniuk A, Lyndin M, Lyndina Y, Sikora V, Hrintsova N, Timakova O, Gudymenko O, Gladchenko O. Changes in the hematopoietic system and blood under the influence of heavy metal salts can be reduced with vitamin E. Turk Patoloji Derg. 2018;34(1):73–81. DOI: 10.5146/tjpath.2017.01412. *(Здобувач виконала експериментальне дослідження, гістологічне та імуногістохімічне вивчення гемопоетичної тканини, інтерпретувала одержані результати).*

5. Романюк АМ, Линдіна ЮМ, Сікора ВВ, Гусак ЄВ, Сумцова НГ. Визначення важких металів у кістковому мозку щурів в умовах модельованого мікроелементозу. Вісник проблем і медицини. 2018;1(142):171–7. *(Дисертант провела атомно-абсорбційне дослідження кісткового мозку щурів, опрацювала отримані результати, підготувала статтю до друку).*

6. Гринцова НБ, Романюк АМ, Линдін МС, Линдіна ЮМ. Вплив забруднювачів водного середовища (солей важких металів) на неспецифічні механізми регуляції гемопоезу за умов підгострої дії та корекції антиоксидантами (І-токоферол). Екологічні науки. 2018;1(20): 126–30. *(Дисертант провела лабораторне дослідження крові піддослідних тварин, інтерпретувала одержані результати).*

7. Линдіна ЮМ, Сікора ВВ, Гириявенко НІ, Линдін МС, Романюк АМ. Дослідження протективних властивостей вітаміну Е на кістковий мозок щурів в умовах підвищеного споживання солей важких металів. Вісник Вінницького

національного медичного університету. 2019;23(1):59–64. *(Дисертант провела експериментальне дослідження, сформулювала результати дослідження та висновки).*

8. Романюк АН, Гринцова НБ, Коробчанська АБ, Сауляк СВ, Линдіна ЮН. Морфологические изменения в костной системе и внутренних органах в условиях влияния на организм солей тяжелых металлов. В: Збірник тез VI конгресу анатомів, гістологів, ембріологів та топографоанатомів України. Актуальні питання анатомії, гістології, ембріології та топографічної анатомії; 2015 Верес 16-18; Запоріжжя. Запоріжжя: Запорізький державний медичний університет; 2015, с. 77. *(Здобувач виконала гістологічне дослідження кісткового мозку, проаналізувала одержані результати).*

9. Линдіна ЮМ, Фесюра ГМ. Дослідження гістологічних особливостей червоного кісткового мозку у статевозрілих щурів. В: Деміхова НВ, редактор. Збірник тез доповідей III Міжнародної науково-практичної конференції студентів та молодих вчених. Актуальні питання теоретичної та практичної медицини; 2015 Квіт 23-24; Суми. Суми: Сумський державний університет; 2015, с. 222–23. *(Дисертант провела гістологічне та імуногістохімічне дослідження гемопоетичної тканини інтактної групи щурів, проаналізувала одержані результати).*

10. Романюк АМ, Линдіна ЮМ. Морфологічні зміни у кістковому мозку щурів за умов впливу на організм солей важких металів. В: Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції. Перспективні напрями наукових досліджень – 2015; 2015 Жовт 17-22; Братислава. Київ: Вид-во «Центр навчальної літератури»; 2015. Том 2; с. 116–17. *(Дисертант провела експериментальне дослідження, опрацювала результати, сформулювала висновки, підготувала тези до друку).*

11. Линдіна ЮМ, Карпенко ЛІ, Фесюра ГМ. Гістологічні особливості стромального компоненту кісткового мозку статевозрілих щурів. В: Деміхова НВ, редактор. Збірник тез доповідей IV Міжнародної науково-практичної конференції студентів та молодих вчених. Актуальні питання теоретичної та практичної медицини; 2016 Квіт 21-22; Суми. Суми: Сумський державний університет; 2016. Том 1; с. 135. *(Здобувач виконала експериментальне дослідження, опрацювала результати дослідження, підготувала тези до друку).*

12. Романюк АМ, Линдіна ЮМ, Линдін МС, Будко ГЮ. Особливості будови кісткового мозку у щурів. В: Матеріали III міжнародної науково-практичної конференції. Природничі читання 2016; 2016 Трав 19-22; Чернівці. Чернівці: Медуніверситет; 2016, с. 69–70. *(Автор виконала гістологічне дослідження, опрацювала результати, сформулювала висновки).*

13. Bambizle D, Lyndina Yu, Romaniuk A, Sikora V. Features of histological and immunohistochemical structure of rat's bone marrow. In: Third global students' conference of biomedical sciences: abstract book; 2016 Oct 20–23; Belgrade. Belgrade: Faculty of Medicine, University of Belgrade; 2016, p. 75. *(Дисертант провела морфологічне дослідження кісткового мозку, опрацювала результати дослідження, сформулювала висновки).*

14. Романюк АМ, Линдіна ЮМ, Фесюра ГМ. Гістоморфологічні зміни кісткового мозку за умов впливу солей важких металів. В: Марковський ВД, Сорокіна ІВ та ін, ред. кол. Збірник матеріалів заочної науково-практичної

конференції з міжнародною участю присвяченої 150-річчю з дня народження професора М. Ф. Мельникова-Разведенкова. Сучасні аспекти морфології людини: успіхи, проблеми та перспективи; 2016 Груд 24; Харків. Харків: ХНМУ; 2016, с. 103–5. *(Здобувач провела експериментальне дослідження, сформулювала висновки, підготувала тези до друку).*

15. Линдіна ЮМ, Фесюра ГМ. Особливості процесу реадaptaції у кістковому мозку щурів після вживання солей важких металів. В: Погорелов МВ, редактор. Збірник тез доповідей V Міжнародної науково-практичної конференції студентів та молодих вчених. Актуальні питання теоретичної та практичної медицини; 2017 Квіт 20-21; Суми. Суми: Сумський державний університет; 2017, с. 195-6. *(Дисертант виконала гістологічне дослідження, опрацювала результати дослідження, сформулювала висновки).*

16. Romaniuk AM, Sikora VV, Lyndina YM, Unawunwa F. Protector properties of the vitamin E in the urinary bladder and bone marrow under conditions of simulated effect of heavy metals in high concentrations. In: Cibakova V, Boychuk TM, editors. Natural Science Readings: abstract book; 2017 May 18-21; Bratislava; 2017, p. 53-4. *(Дисертант провела гістологічне дослідження, опрацювала результати дослідження, підготувала тези до друку).*

17. Линдіна ЮМ. Особливості елементного складу кісткового мозку щурів за умов споживання солей важких металів. В: Погорелов МВ, редактор. Збірник тез доповідей Всеукраїнської науково-методичної конференції, що присвячена 25-річчю Медичного інституту Сумського державного університету. Перспективи розвитку медичної науки і освіти; 2017 Лист 16-17; Суми. Суми: Сумський державний університет; 2017, с. 28.

18. Романюк АМ, Линдіна ЮМ. Особливості гематологічних показників за умови впливу солей важких металів на статевозрілих щурів-самців. В: Вадзюк СН, редактор. Збірник матеріалів науково-практичної конференції. Довкілля і здоров'я; 2017 Квіт 27-28, Тернопіль. Тернопіль: Укрмедкнига; 2017, с. 205-6. *(Здобувач провела експериментальне дослідження, опрацювала статистичні дані та результати дослідження, сформулювала висновки).*

19. Линдіна ЮМ. Порівняльний аналіз морфологічної будови кісткового мозку щурів та людини. В: Корда ММ, редактор. Матеріали ХХІІ Міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених; 2018 Квіт 23–25; Тернопіль. Тернопіль: Укрмедкнига; 2018, с. 265-6.

20. Романюк АМ, Линдіна ЮМ, Карпенко ЛІ. Вивчення мієлопротективних властивостей вітаміну Е при надходженні підвищеної кількості солей важких металів у статевозрілих щурів. В: Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої 60-річчю від дня народження професора Ю.Т. Ахтемійчука. Індивідуальна анатомічна мінливість органів та структур організму в онтогенезі; 2018 Верес 13-15; Чернівці. Чернівці: Медуніверситет, 2018, с. 116–7. *(Дисертант провела гістологічне дослідження кісткового мозку, підготувала результати та сформулювала висновки).*

АНОТАЦІЯ

Линдіна Ю. М. Морфологічні особливості кісткового мозку за умов впливу солей важких металів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.01 – нормальна анатомія. – Сумський державний університет МОН України, Суми, 2020.

Дисертаційна робота спрямована на вивчення морфофункціональних особливостей кісткового мозку статевозрілих щурів і хімічного складу гемопоетичної тканини за умов дії на організм важких металів та обґрунтування можливості корекції їх пошкоджувальної дії вітаміном Е. Для комплексного вивчення варіабельності гемопоетичної тканини та крові в умовах мікроелементозу було визначено дизайн дослідження, що включав використання 84 статевозрілих білих щурів-самців, яких було поділено на групи та серії згідно з умовами й тривалістю спостереження.

Під час гістологічного, гістохімічного та імуногістохімічного досліджень препаратів кісткового мозку щурів виявлено, що надмірне споживання солей важких металів призводить до зменшення площі еритроцито- та гранулоцитопоезу за одночасного зростання кількості мегакаріоцитів. Одночасно відбуваються виражені коливання якісних показників гемопоетичної тканини, що виявляються дистрофічно-некротичними та початковими диспластичними змінами в усіх його складових. Гематотоксична дія проявляється порушенням функціональної здатності кісткового мозку у вигляді коливання показників загального аналізу крові, які безпосередньо залежать від терміну споживання важких металів та ступеня їх накопичення.

За рахунок додавання вітаміну Е в терапевтичних дозах до раціону щурів спостерігалось зменшення негативних морфологічних змін у кістковому мозку та крові впродовж уживання солей важких металів, а також прискорення регенераторних можливостей кровотворної тканини в період відновлення.

Ключові слова: кістковий мозок, солі важких металів, вітамін Е, гранулоцитопоез, еритроцитопоез, тромбоцитопоез, кров.

АННОТАЦИЯ

Линдина Ю. Н. Морфологические особенности костного мозга в условиях влияния солей тяжелых металлов. – Квалификационный научный труд на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.01 – нормальная анатомия. – Сумский государственный университет МОН Украины, Сумы, 2020.

Диссертационная работа направлена на изучение морфофункциональных особенностей костного мозга половозрелых крыс и химического состава гемопоэтической ткани при действии на организм тяжелых металлов и обоснование возможности коррекции их повреждающего действия витамином Е. Для комплексного изучения вариабельности гемопоэтической ткани и крови в условиях

микроэлементоза был определен дизайн исследования, включающий использование 84 беспородных половозрелых белых крыс-самцов, которые были распределены на группы и серии согласно условиям и продолжительности наблюдения.

При гистологическом, гистохимическом и иммуногистохимическом исследованиях препаратов костного мозга крыс выявлено, что чрезмерное потребление солей тяжелых металлов приводит к уменьшению площади эритроцито- и гранулоцитопоэза при одновременном росте количества мегакариоцитов. Одновременно происходят существенные колебания качественных показателей гемопоэтической ткани, проявляющиеся дистрофически-некротическими и начальными диспластическими изменениями во всех его составляющих. Гематотоксическое действие проявляется нарушением функциональной способности костного мозга в виде колебания показателей общего анализа крови, непосредственно зависящих от срока потребления тяжелых металлов и степени их накопления.

За счет добавления витамина Е в терапевтических дозах в рацион крыс наблюдались уменьшение негативных морфологических изменений в костном мозге и крови на протяжении употребления солей тяжелых металлов, а также ускорение регенераторных возможностей кроветворной ткани в период восстановления.

Ключевые слова: костный мозг, соли тяжелых металлов, витамин Е, гранулоцитопоэз, эритроцитопоэз, тромбоцитопоэз, кровь.

SUMMARY

Lyndina Yu. M. Morphological features of the bone marrow under the heavy metal salts influence. – Qualification scientific work on the manuscript rights.

Thesis for acquiring academic degree of Candidate of Medical Sciences according to specialty 14.03.01 – normal anatomy. – Sumy State University of the Ministry of Education and Science of Ukraine, Sumy, 2020.

For a complex study of the effects of heavy metals, a design of research was identified which included the use of 84 pubescent white male rats. In order to determine the action of pollutants on the bone marrow and the restorative capacity of hematopoietic tissue, animals had been into two groups divided. Addition of vitamin E to the animal diet was the basis for dividing all the animals into series in order to study the protective properties of the corrector.

The study of the main results of the experiment and the rationale for using the corrector for preventive-therapeutic purposes were performed at the expense of modern research methods (microscopic examination of morphological changes of bone marrow in histological, histochemical and immunohistochemical slides, their morphometry, quantitative evaluation of indicators of the chemical composition of hematopoietic tissue, study of indicators of general and biochemical analysis of blood, statistical processing of digital data).

It was found that the addition of heavy metals to the diet of animals leads to their accumulation in hematopoietic tissue. This is accompanied by a decrease in the area of the erythrocyto- and granulocytogenesis while increasing the number of megakaryocytes. Moreover, there are significant fluctuations in the qualitative composition of the bone

marrow, which are manifested by dystrophic-necrotic and initial dysplastic changes in all its components. We found that the haematotoxic action is manifested by a violation of the functional capacity of the hematopoietic tissue in the form of fluctuations in indicators of general blood analysis, which are directly dependent on the period of consumption of heavy metals and their degree of accumulation.

Due to the use of a complex of modern methods, the features of bone marrow re-adaptation capabilities have been established, provided that xenobiotics are discontinued. The expressed restorative possibilities of hematopoietic tissue, which also depend on the term of observation, are shown. It was found that even within 90 days after the abolition of the pollutants, there was no complete removal of heavy metals from the body that turned out a deviation from the norm of qualitative and quantitative indicators of myeloid tissue and blood.

For the first time, under the experimental conditions of excessive intake of heavy metals salts, the protective properties of vitamin E were studied for restoration of normal structure and function of bone marrow of experimental animals. By adding it at therapeutic doses to the diet of rats, there was a decrease in negative morphological changes in the bone marrow and blood during the use of heavy metal salts, as well as accelerating the regenerative capacity of hematopoietic tissue during the recovery period.

The complex analysis of the obtained results made it possible to clarify and supplement information on the pathogenetic links of the negative influence of heavy metals on the process of hematopoiesis, which is realized through the direct and indirect influence of exogenous pollutants on various sprouts of hematopoiesis. A clear link between the hematotoxic effect of xenobiotics and the functioning of the hematopoietic blood system was revealed.

On the basis of the results of a comprehensive experimental study, the structural features of the bone marrow of rats were clarified and its key differences from human hematopoietic tissue were determined, both in normal and during the consumption of xenobiotics. This may be the basis for further modeling of changes in hematopoietic tissue when studying the effects of damaging factors. The revealed results demonstrate in detail the fluctuations of hematopoiesis and blood indices during consumption of a mixture of heavy metal salts. The established changes clearly demonstrate the pronounced hematotoxic effect of these xenobiotics upon their excessive admission to the body.

Key words: bone marrow, heavy metal salts, vitamin E, granulocytopoiesis, erythrocytopoiesis, thrombocytopoiesis, blood.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АФК – активні форми кисню.

БАК – біохімічний аналіз крові.

ВМ – важкі метали.

Нв – гемоглобін.

ДАБ – діамінобензидин.

ЗАК – загальний аналіз крові.

ІГХ дослідження – імуногістохімічне дослідження.

КМ – кістковий мозок.

МЕ – мікроелементи.

МПО – мієлопероксидаза.

М:Е співвідношення – мієлоїдно:еритроїдне співвідношення.

ПОЛ – перекисне окиснення ліпідів.

СВМ – солі важких металів.

ФЕК – форменні елементи крові.

Підписано до друку 08.01.2020.

Формат 60x90/16. Ум. друк. арк. 1,1. Обл.-вид. арк. 0,9. Тираж 100 пр. Зам. № 3.

Видавець і виготовлювач

Сумський державний університет,

вул. Римського-Корсакова, 2, м. Суми, 40007

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 3062 від 17.12.2007.