

ОЦЕНКА КРАСНОГО КОСТНОГО МОЗГА В ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Тютин К. В., Гуцин Я. А., Макарова М. Н., Макаров В. Г.

ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации», Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Тютин Ксения Владимировна,
ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации»,
пос. Кузьмолковский, стр. 245,
Всеволожский район, Ленинградская область, Россия, 188663.
E-mail: tyutina.kv@doclinika.ru

*Статья поступила в редакцию 06.05.2020
и принята к печати 12.10.2020.*

Резюме

Актуальность. Исследование красного костного мозга (ККМ) в доклинических исследованиях является важной составляющей программы изучения лекарственного средства. **Цель.** Провести сравнительную оценку результатов, получаемых в параллельных исследованиях материала от одного и того же животного двумя разными методами для крыс, кроликов и мышей (цитологическое исследование материала, полученного из бедренной кости, и гистологическое исследование материала, полученного из грудины). **Материалы и методы.** Был изучен костный мозг, полученный от интактных животных. Цитологический препарат окрашивали по Романовскому–Гимзе, а гистологический подготавливали обычным образом и окрашивали гематоксилин-эозином. Окрашенные препараты исследовали с помощью микроскопа. **Результаты.** В результате данного исследования были получены массивы данных миелограмм с лейкоэритробластным соотношением и индексом созревания нейтрофилов. **Заключение.** При проведении доклинических исследований наиболее целесообразными можно признать забор костного мозга из бедренной кости; забор можно проводить как для цитологического исследования, так и для гистологического; с учетом высокой вариативности показателей в доклинических исследованиях миелограмм необходимо иметь группы интактных животных того же вида, не получавших исследуемый препарат; наименее вариативны оказались миелограммы у кроликов как по результатам собственных исследований, так и при сравнении с литературными данными, что позволяет признать кроликов наилучшим объектом для изучения состава и функции красного костного мозга. При сравнении литературных данных существенных закономерностей по количеству клеток в разных возрастных периодах у изученных видов животных не наблюдалось, и, следовательно, в доклинических исследованиях с анализом ККМ можно использовать животных любого возраста.

Ключевые слова: гистологическое исследование, красный костный мозг, лейкоциты, миелограмма, цитологическое исследование.

Для цитирования: Тютин К.В., Гуцин Я.А., Макарова М.Н. и др. Оценка красного костного мозга в доклинических исследованиях. Трансляционная медицина. 2020; 7 (5): 119-130. DOI: 10.18705/2311-4495-2020-7-5-119-130

EVALUATION OF BONE MARROW IN PRECLINICAL STUDIES

Tyutina K. V., Gushchin Y. A., Makarova M. N., Makarov V. G.

Saint Petersburg Institute of Pharmacy, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Tyutina Ksenia V.,
Saint Petersburg Institute of Pharmacy,
Kuzmolovskiy settl. 245, Vsevolozhsk
district, Leningrad region, Russia, 188663.
E-mail: tyutina.kv@doclinika.ru

Received 06 May 2020; accepted 12 October
2020.

Abstract

Background. The study of red bone marrow in preclinical studies is an important component of the study program of the drug. **Objective.** To compare the results obtained in parallel studies of the material from the same animal by two different methods for rats, rabbits and mice (cytological examination of the material obtained from the femur and histological examination of the material obtained from the sternum). **Design and methods.** Bone marrow obtained from intact animals was studied. Cytological preparation was stained according to Romanowski–Giemsa, histological preparation was prepared in the usual way and stained with hematoxylin-eosin. Stained preparations were examined by microscope. **Results.** As a result of this study was sets of myelograms with leuko-erythroblast ratio and neutrophil maturation index. **Conclusion.** A number of conclusions were made: when conducting preclinical studies, the most appropriate can be considered a bone marrow sampling from the femur; the fence can be carried out both for cytological examination, and for histological; taking into account the high variability of indicators in preclinical studies of myelograms, it is necessary to have control groups of (intact) animals of the same species that did not receive the study drug; Myelograms in rabbits turned out to be the least varied, both according to the results of our own studies (with histological and cytological studies), and when compared with literature data, which allows us to recognize rabbits as the best object for studying the composition and function of red bone marrow; when comparing the literature data, significant patterns in the number of cells at different age periods were not observed in the studied animal species, and, therefore, in preclinical studies using KKM analysis, animals of any age can be used

Key words: cytological examination, histological examination, leukocytes, myelogram, red bone marrow.

For citation: Tyutina KV, Gushchin YA, Makarova MN, et al. Evaluation of bone marrow in preclinical studies. Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine. 2020; 7 (5): 119-130. (In Russ.) DOI: 10.18705/2311-4495-2020-7-5-119-130

Список сокращений: ККМ — красный костный мозг.

Введение

Исследование красного костного мозга (ККМ) в доклинических исследованиях является важной составляющей программы изучения лекарственного средства. Необходимость в этом возникает при оценке противоопухолевых, противосудорожных, некоторых противомикробных и противовоспалительных препаратов. При исследовании препарата, для которого заранее известно или предполагается

с большой долей вероятности, что он может влиять на ККМ, необходимо предусмотреть процедуру извлечения костного мозга для расчета миелограммы и иметь специалиста, способного провести подобный анализ. Если изучаемый лекарственный препарат абсолютно новый или это препарат, для которого влияние на ККМ ранее не было проверено, а в ходе исследования выявлены существенные изменения формулы периферической крови, то принятие решения об исследовании ККМ должно произойти пока исследование не вступило в завершающую фазу.

Существует несколько способов исследования ККМ, среди которых самые распространенные методы цитологического и гистологического анализа. Чаще в качестве оценки используют цитологическое исследование костного мозга. Однако появляется все больше данных о гистологической диагностике таких нарушений, хотя их гистологическая верификация довольно сложна и требует высокой квалификации оператора, проводящего анализ.

Цитологическое исследование ККМ позволяет оценить процентное соотношение различных фракций клеток крови и их предшественников, косвенно оценить цитоз и состояние мегакариоцитарного ростка. Плюсами этого метода исследования считаются достаточно высокая информативность при небольших материальных затратах, сравнительная быстрота исследования и получение количественных характеристик исследуемого объекта [1–3]. К недостаткам этого метода в доклинических исследованиях можно отнести тот факт, что, как правило, анализ периферической крови проводится одновременно или после эвтаназии животных, а при обнаружении отклонений уже невозможно забрать ККМ на анализ, то есть требуется дополнительное исследование для выявления наличия/отсутствия изменений в ККМ. Также исследование трудоемкое как на этапе получения образцов, так и на этапе анализа. Приготовленные для анализа образцы не рекомендуют долго хранить (до 1 недели в нативном виде).

В отличие от цитологического исследования костного мозга, гистологическое позволяет более точно оценить клеточность костного мозга, соотношение и локализацию клеток различных ростков гемопоэза, состояние стромы, васкуляризацию костного мозга, наличие реактивных изменений, наличие плазматических клеток, гистиоцитов, макрофагов, тучных клеток, нарушение обмена железа [4–5]. К недостаткам метода можно отнести длительность приготовления гистологических препаратов (до 2 недель), но при этом материал может быть забран в ходе эвтаназии животных еще при отсутствии информации о необходимости исследования ККМ и сохранен до 1 года без потерь.

Целью данного исследования стала сравнительная оценка результатов, получаемых в параллельных исследованиях материала от одного и того же животного двумя разными методами для крыс, кроликов и мышей (цитологическое исследование материала, полученного из бедренной кости, и гистологическое исследование материала, полученного из грудины). Также чуть позднее дополнительно было проведено гистологическое исследование

материала, полученного из бедренной кости от животных тех же видов.

Материалы и методы

В нашем исследовании был изучен костный мозг, полученный от интактных животных, используемых в ходе работ, проводимых в организации, то есть специально для данного эксперимента эвтаназию животных не проводили. Цитологический препарат окрашивали по Романовскому–Гимзе, а гистологический подготавливали обычным образом [4–5] и окрашивали гематоксилин-эозином. Окрашенные препараты исследовали с помощью микроскопа (ув. $\times 1000$).

В результате данного исследования были получены массивы данных миелограмм с лейко-эритробластным соотношением и индексом созревания нейтрофилов (табл. 1–3).

Соотношение лейкоцитов (Leu) и эритроцитов (Er) рассчитывали по формуле:

$$\text{Соотношение Leu/Er} = (\text{Миелоциты (\%)} + \text{Метамиелоциты (\%)} + \text{Палочкоядерные нейтрофилы (\%)} + \text{Сегментоядерные нейтрофилы (\%)}) / (\text{Предшественники эритроцитов (\%)}).$$

Индекс созревания нейтрофилов рассчитывали по формуле:

$$\text{Индекс созревания нейтрофилов} = (\text{Миелоциты (\%)} + \text{Метамиелоциты (\%)}) / (\text{Палочкоядерные нейтрофилы (\%)} + \text{Сегментоядерные нейтрофилы (\%)}).$$

Для массивов каждого из видов были рассчитаны среднее значение и стандартная ошибка среднего.

Результаты

Как видно из данных, представленных в таблице 1, при гистологическом анализе клеточного состава ККМ грудины наиболее вариативными показателями являются бластные клетки (% ошибки у разных видов животных составляет от 60 до 76 %), что связано с относительным разобщением эритроцитарного и лимфоцитарного ростков кроветворения, а также сложностью получения монослоя клеток в срезе, в результате чего затруднена дифференцировка клеток. Относительно высокий процент ошибки наблюдался и при оценке лимфоцитов (от 40 до 60 %).

Такая высокая вариабельность, как было указано выше, связана со сложностью анализа препаратов, а также с длительным процессом декальцинации,

Таблица 1. Результаты исследования ККМ, полученного из грудины, гистологическим методом (M ± m, %)

| Параметр | Вид животных | Кролики, n = 7 | | Мыши, n = 5 | | Крысы, n = 7 | |
|---------------------------------|--------------|----------------|----------|-------------|----------|--------------|----------|
| | | M ± m | % ошибки | M ± m | % ошибки | M ± m | % ошибки |
| Предшественники эритроцитов | | 20 ± 4,5 | 22 | 27 ± 6,6 | 24 | 25 ± 4,3 | 17 |
| Миелоциты и метамиелоциты | | 20 ± 7,1 | 35 | 21 ± 4,5 | 21 | 32 ± 5,6 | 17 |
| Палочкоядерные и с/я нейтрофилы | | 33 ± 7,1 | 22 | 35 ± 7,4 | 21 | 28 ± 4,8 | 17 |
| Предшественники эозинофилов | | 8 ± 2,8 | 35 | 4 ± 1,9 | 46 | 6 ± 1,9 | 30 |
| Моноциты | | 8 ± 2,5 | 32 | 4 ± 1,5 | 40 | 2 ± 1,0 | 41 |
| Лимфоциты | | 10 ± 6,3 | 64 | 8 ± 3,0 | 40 | 6 ± 2,3 | 41 |
| Бластные клетки | | 1,60 ± 1,07 | 67 | 0,88 ± 0,53 | 60 | 1,41 ± 1,07 | 76 |
| Индекс созревания нейтрофилов | | 0,68 ± 0,36 | 53 | 0,64 ± 0,27 | 42 | 1,20 ± 0,38 | 32 |
| Соотношение Leu/Er | | 3,16 ± 0,74 | 24 | 2,33 ± 0,70 | 30 | 2,74 ± 0,56 | 20 |

Таблица 2. Результаты исследования ККМ, полученного из бедренной кости, гистологическим методом (M ± m, %)

| Параметр | Вид животных | Кролики, n = 7 | | Мыши, n = 10 | | Крысы, n = 7 | |
|---------------------------------|--------------|----------------|----------|--------------|----------|--------------|----------|
| | | M ± m | % ошибки | M ± m | % ошибки | M ± m | % ошибки |
| Предшественники эритроцитов | | 23 ± 2,2 | 10 | 27 ± 4,1 | 15 | 23 ± 2,4 | 11 |
| Миелоциты и метамиелоциты | | 20 ± 3,4 | 17 | 28 ± 3,2 | 11 | 36 ± 4,7 | 13 |
| Палочкоядерные и с/я нейтрофилы | | 37 ± 3,2 | 9 | 28 ± 3,9 | 14 | 20 ± 3,6 | 19 |
| Предшественники эозинофилов | | 9 ± 0,4 | 5 | 7 ± 1,1 | 15 | 9 ± 2,6 | 30 |
| Моноциты | | 4 ± 0,9 | 20 | 4 ± 0,9 | 24 | 5 ± 1,9 | 36 |
| Лимфоциты | | 5 ± 1,2 | 22 | 5 ± 1,1 | 22 | 5 ± 1,3 | 24 |
| Бластные клетки | | 1,49 ± 0,77 | 51 | 1,07 ± 0,72 | 67 | 1,48 ± 0,63 | 43 |
| Индекс созревания нейтрофилов | | 0,55 ± 0,14 | 25 | 1,00 ± 0,18 | 18 | 1,96 ± 0,77 | 39 |
| Соотношение Leu/Er | | 2,96 ± 0,34 | 11 | 2,41 ± 0,51 | 21 | 2,81 ± 0,42 | 15 |

что приводит к значительным искусственным изменениям в финальном препарате (рис. 1–4).

Если сравнить вариабельность показателей между разными видами животных, то наименее

«вариабельными» животными можно считать крыс (за исключением показателя бластных клеток).

Как видно из данных, представленных в таблице 2, при гистологическом анализе клеточного состава

ККМ бедренной кости вариабельность по всем видам животных существенно ниже, чем при анализе грудины. Наиболее вариативными показателями также являются бластные клетки (% ошибки у разных видов животных составляет от 43 до 67 %). При оценке лимфоцитов вариабельность при такой локализации забора ККМ существенно ниже (от 22 до 24 %).

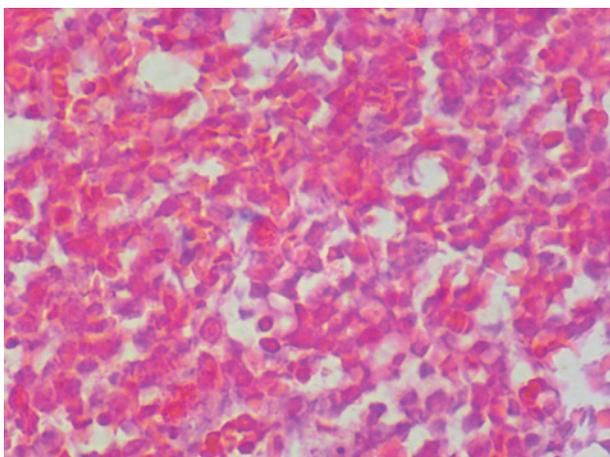


Рис. 1. Срез грудины крысы. Клетки искусственно изменены после декальцинации, толстый срез. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение $\times 400$

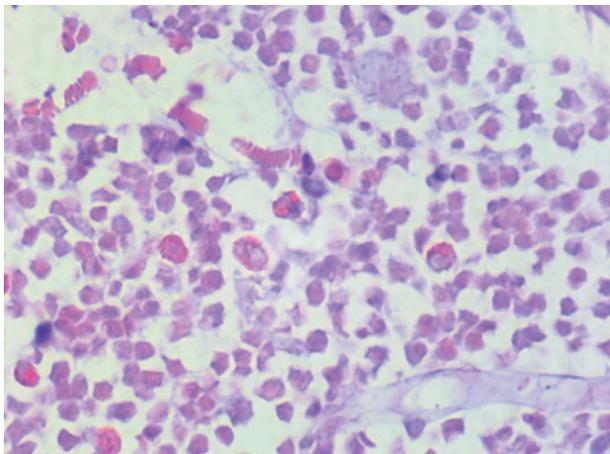


Рис. 2. Срез грудины кролика. Клетки искусственно изменены после декальцинации. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение $\times 400$

Если сравнить вариабельность показателей между разными видами животных, то наименее «вариабельными» животными можно считать кроликов.

При изготовлении препаратов костного мозга, взятого из бедренной кости животных, большинство имело удовлетворительное качество изготовления. Основная проблема состояла в получении достаточно тонкого среза. Но из-за скудного объема получаемого

материала (особенно у мышей) не удалось получить тонкий срез на значительном протяжении, что затрудняло дифференцировку клеток. Еще одним фактором является «деликатность» материала и его сжатие в процессе гистологической проводки (рис. 5–8).

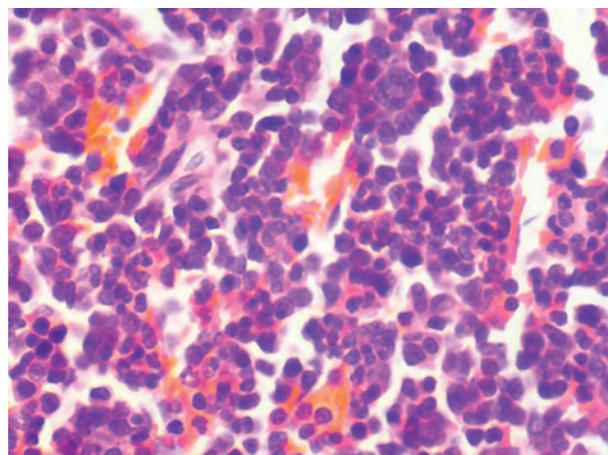


Рис. 3. Срез грудины кролика. Клетки частично искусственно изменены после декальцинации, толстый срез. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение $\times 400$

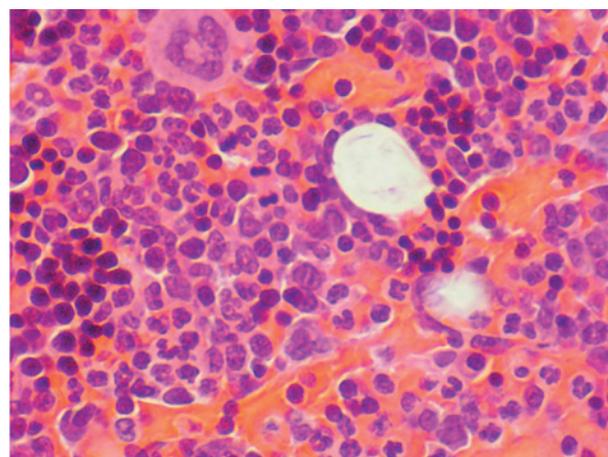


Рис. 4. Срез грудины крысы. Клетки в меньшей степени искусственно изменены после декальцинации, срез 2–4 слоя клеток, возможна дифференцировка клеток. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение $\times 400$

В целом можно сделать вывод, что гистологический метод исследования костного мозга грудины не оправдал себя. В то же время материал, полученный из бедренной кости, при исключении этапа декальцинации, пригоден для анализа, хотя для получения более достоверных данных, вероятно, необходимо увеличить количество анализируемых клеток в 1,5–2 раза, что, однако, значительно удлинит время анализа.

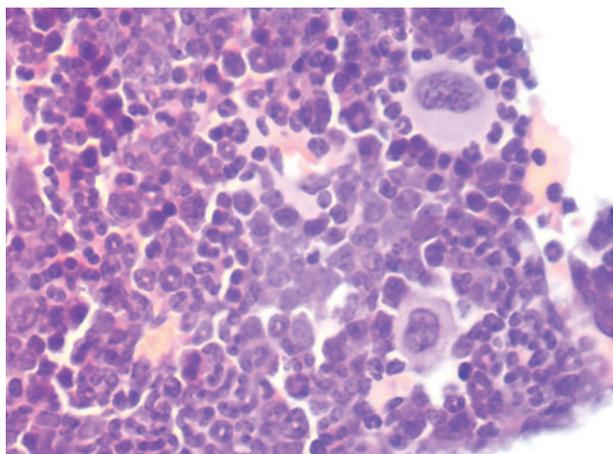


Рис. 5. Срез костного мозга из бедренной кости крысы. Толстый срез. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение $\times 400$

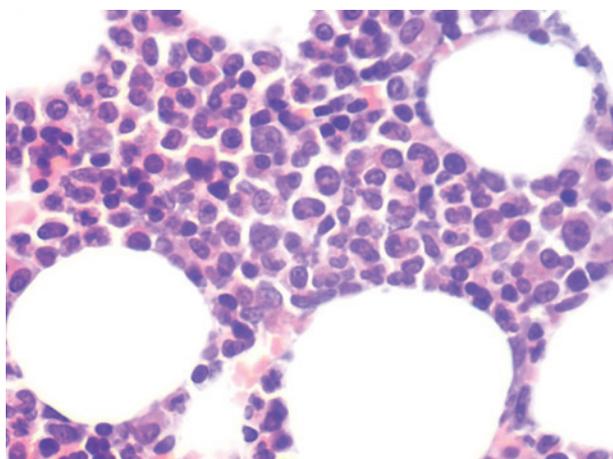


Рис. 6. Срез костного мозга из бедренной кости крысы. Удовлетворительная толщина среза в 2–3 слоя клеток, хорошее качество окраски. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение $\times 400$

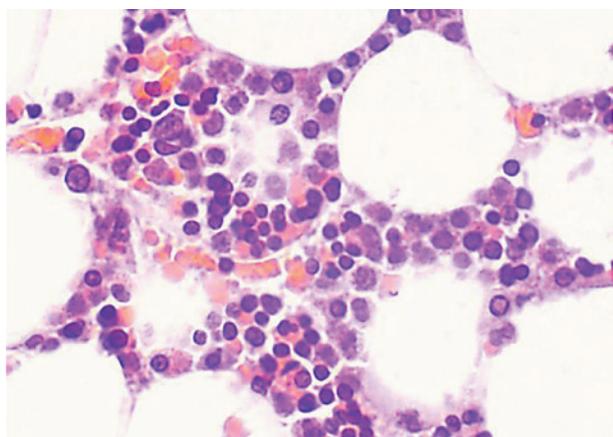


Рис. 7. Срез костного мозга из бедренной кости мыши. Удовлетворительная толщина среза в 2–3 слоя клеток, хорошее качество окраски. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение $\times 400$

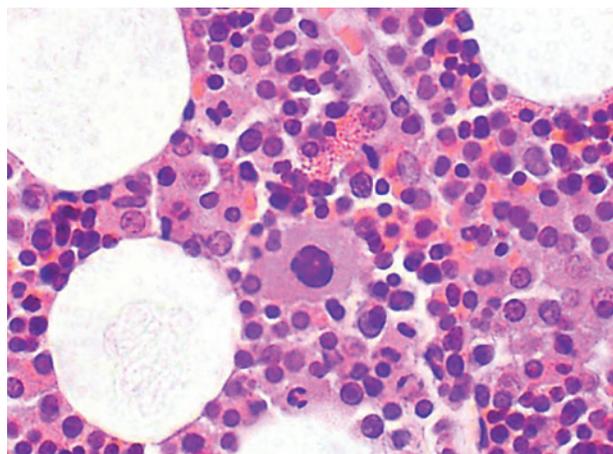


Рис. 8. Срез костного мозга из бедренной кости кролика. Удовлетворительная толщина среза в 2–3 слоя клеток, хорошее качество окраски. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение $\times 400$

Как видно из данных, представленных в таблице 3, при цитологическом анализе клеточного состава ККМ бедренной кости вариативность по всем видам животных довольно высока. Наиболее вариативным показателем оказались также бластные клетки (% ошибки у разных видов животных составляет от 42 до 99 %). На увеличение вариативности оказывают влияние многие факторы, в том числе нарушение структуры ККМ при изготовлении препарата (смещение клеток во время выполнения мазка, нарушение микроархитектоники ткани), особенности окрашивания (более толстые участки препарата хуже прокрашиваются при стандартном протоколе окрашивания, однако, если намеренно увеличивать время окрашивания или концентрацию красителя, и более тонкие участки «перекрашиваются», что создает трудности для интерпретации видов клеток) (рис. 9, 10). Очень высокая вариативность отмечена также для моноцитов при исследовании ККМ от крыс (199 %) и мышей (87 %), а также для предшественников эозинофилов от крыс (91 %) и от мышей (149 %).

Интересно, что полученные данные совпадали с литературными (табл. 4–6), где также наблюдалась наибольшая вариативность у крыс и мышей по моноцитам, а у мышей и кроликов по показателю лимфоцитов. Если сравнить вариативность показателей между разными видами животных, то наименее вариативными животными можно считать кроликов.

Статистически значимых различий между результатами, полученными с помощью всех трех использованных методик, обнаружено не было (был использован t-критерий Стьюдента). Примечательно, что нет различий между результатами гистоло-

Таблица 3. Результаты исследования ККМ, полученного из бедренной кости, цитологическим методом ($M \pm m$, %)

| Вид животных Параметр | Кролики, n = 7 | | Мыши, n = 5 | | Крысы, n = 7 | |
|---------------------------------|----------------|----------|-------------|----------|--------------|----------|
| | $M \pm m$ | % ошибки | $M \pm m$ | % ошибки | $M \pm m$ | % ошибки |
| Предшественники эритроцитов | 39 ± 3,0 | 8 | 34 ± 5,6 | 17 | 28 ± 5,6 | 20 |
| Миелоциты и метамиелоциты | 11 ± 1,3 | 12 | 14 ± 4,3 | 31 | 19 ± 7,9 | 41 |
| Палочкоядерные и с/я нейтрофилы | 33 ± 3,6 | 11 | 32 ± 6,4 | 20 | 37 ± 8,6 | 23 |
| Предшественники эозинофилов | 7 ± 1,8 | 27 | 0 ± 0,3 | 149 | 2 ± 1,7 | 91 |
| Моноциты | 2 ± 0,3 | 15 | 0 ± 0,2 | 87 | 0 ± 0,7 | 199 |
| Лимфоциты | 5 ± 3,9 | 74 | 19 ± 8,1 | 43 | 13 ± 4,6 | 35 |
| Бластные клетки | 2,26 ± 2,24 | 99 | 1,34 ± 0,56 | 42 | 0,60 ± 0,54 | 90 |
| Индекс созревания нейтрофилов | 0,35 ± 0,04 | 13 | 0,44 ± 0,11 | 25 | 0,54 ± 0,21 | 38 |
| Соотношение Leu/Eг | 1,30 ± 0,10 | 8 | 1,41 ± 0,37 | 26 | 2,18 ± 0,65 | 30 |

гического исследования ККМ, полученного от разных животных из бедренной кости и из грудины.

Данные, полученные в результате подсчета миелограмм в цитологических препаратах, совпадают с данными, представленными нами ранее в справочнике «Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных» [6].

Данные цитологического исследования ККМ, представленные в литературе [2, 7, 8–15], очень разнообразны и различаются между собой, при анализе обращает на себя внимание факт отсутствия единой системы подсчета миелограмм, отсутствие единого принципа анализа полученных данных и большая вариативность. Процитированные нами авторы приводят результаты по разному набору групп клеток, используя либо абсолютные значения подсчета клеток, либо процентное соотношение по отдельным группам клеток, например отдельный пересчет на 100 % эритроидного и миелоидного ростков, либо процентные соотношения по всем группам клеток. В сравнении с полученными нами данными, принятыми за 100 %, данные различных публикаций отличались на 20–1600% (табл. 4–6), при этом наименьшие различия были обнаружены в литературных данных, полученных для кроликов, где отличия составили 20–250 %, тогда как для мышей и для крыс различия достигали больших значений (50–1200 % для крыс и 50–1600 % для мышей).

Значение процентного соотношения вычислялось по формуле:

$$\text{Процентное соотношение} = (A \times 100 \%) / B,$$

где А — значение (в %) группы клеток по отношению ко всему числу клеток, указанное в литературных источниках, В — значение (в %) группы клеток по отношению ко всему числу клеток, полученное в рамках проведенного нами исследования.

Высокая сходимость данных, полученных нами в 2013 [6] и 2020 гг., связана с тем, что для получения и тех, и других результатов использовались животные из одного источника, а аналитические манипуляции проводились по единому протоколу, при этом существенных закономерностей по количеству клеток в разных возрастных периодах у крыс не наблюдалось, но наблюдались существенные отличия у самцов и самок.

Заключение

Проведенное исследование позволяет сделать следующие выводы:

1. При проведении доклинических исследований наиболее целесообразным можно признать забор костного мозга из бедренной кости.
2. Забор можно проводить как для цитологического исследования, так и для гистологического. При этом вариативность гистологического исследова-

Таблица 4. Процентное соотношение показателей миелограмм относительно полученных нами значений у крыс

| Литературные источники | Hulse E. V. (1964) | | Endicott K. M., & Ott M. (1945) | | Справочник (2013) | | | | | | | | | | M ± m, %* |
|---------------------------------|--------------------|---------|---------------------------------|-----------|-------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------------|
| | 15 мес. | 16 мес. | < 60 дней | > 60 дней | ♂ 8 нед. | ♂ 12 нед. | ♂ 20 нед. | ♂ 32 нед. | ♂ 36 нед. | ♀ 8 нед. | ♀ 12 нед. | ♀ 20 нед. | ♀ 32 нед. | ♀ 36 нед. | |
| Пол, возраст животных | 102 | 103 | 191 | 110 | 107 | 117 | 122 | 118 | 120 | 105 | 100 | 101 | 105 | 109 | 115 ± 23 |
| Предшественники эритроцитов | 58 | 38 | 43 | 78 | 49 | 41 | 49 | 48 | 47 | 40 | 43 | 45 | 44 | 47 | 48 ± 10 |
| Миелоциты и метамиелоциты | 59 | 56 | 43 | 78 | 77 | 73 | 64 | 64 | 63 | 76 | 70 | 66 | 70 | 67 | 66 ± 9 |
| Палочкоядерные и с/я нейтрофилы | 228 | 207 | 249 | 430 | 57 | 57 | 52 | 57 | 57 | 110 | 78 | 84 | 102 | 87 | 133 ± 109 |
| Предшественники эозинофилов | 609 | 487 | — | — | 2557 | 2313 | 2161 | 2648 | 2617 | 87 | 143 | 131 | 117 | 118 | 1166 ± 1160 |
| Моноциты | 139 | 187 | 114 | 103 | 131 | 170 | 162 | 162 | 162 | 124 | 135 | 124 | 124 | 124 | 140 ± 25 |
| Лимфоциты | 417 | 317 | 217 | 317 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 317 ± 82 |
| Бластные клетки | 95 | 66 | 87 | 49 | 63 | 55 | 75 | 73 | 72 | 82 | 95 | 106 | 98 | 108 | 80 ± 19 |
| Индекс созревания нейтрофилов | 62 | 53 | 28 | 88 | 105 | 110 | 87 | 96 | 101 | 104 | 100 | 100 | 100 | 96 | 88 ± 24 |
| Соотношение Leu/Eg | | | | | | | | | | | | | | | |

Примечание: * — среднее значение по всем литературным источникам относительно, полученных нами значений.

Таблица 5. Процентное соотношение показателей миелограмм относительно полученных нами значений у кроликов

| Литературные источники | Справочник (2013) | | Sabin F. R., et al. (1936) | | | | | Дико-винова Н. В., 1957 | M ± m, % |
|---------------------------------|-------------------|-------|----------------------------|--------|--------|--------|--------|-------------------------|----------|
| | Самцы | Самки | 1 мес. | 2 мес. | 3 мес. | 4 мес. | 5 мес. | | |
| Пол, возраст животных | | | | | | | | | |
| Предшественники эритроцитов | 105 | 105 | 118 | 153 | 140 | 97 | 132 | 108 | 120 ± 20 |
| Миелоциты и метамиелоциты | 94 | 36 | 88 | 42 | 40 | 35 | 44 | 91 | 59 ± 27 |
| Палочкоядерные и с/я нейтрофилы | 269 | 271 | 113 | 90 | 108 | 140 | 119 | 91 | 150 ± 76 |
| Предшественники эозинофилов | 33 | 36 | 6 | 10 | 40 | 13 | 16 | 21 | 22 ± 13 |
| Моноциты | 76 | 80 | – | – | – | – | – | 67 | 74 ± 6 |
| Лимфоциты | 270 | 250 | – | – | – | – | – | 221 | 247 ± 24 |
| Бластные клетки | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| Индекс созревания нейтрофилов | 110 | 103 | 78 | 47 | 37 | 25 | 37 | 100 | 67 ± 35 |
| Соотношение Leu/Eg | 107 | 115 | 84 | 47 | 62 | 110 | 69 | 78 | 84 ± 25 |

дования меньше, чем цитологического, что может быть связано со смещением материала, нарушением архитектоники костного мозга (в отличие от материала для гистологического анализа).

3. С учетом высокой вариативности показателей в доклинических исследованиях миелограмм необходимо иметь группы контроля (интактных) животных того же вида, не получавших исследуемый препарат.

4. Наименее вариативны оказались миелограммы у кроликов как по результатам собственных исследований (при гистологическом и при цитологическом исследованиях), так при сравнении с литературными данными, что позволяет признать кроликов наилучшим объектом для изучения состава и функции красного костного мозга.

5. При сравнении литературных данных существенных закономерностей по количеству клеток в разных возрастных периодах у изученных видов животных не наблюдалось, а, следовательно, в доклинических исследованиях при анализе ККМ можно использовать животных любого возраста.

Полученные данные предполагается использовать в качестве норм для выполнения исследовательских работ. Для проведения оценки изменений в ККМ в течение одного исследования следует

придерживаться какой-либо одной методики получения миелограмм — цитологической или гистологической. Также рекомендуется для каждой отдельной научно-исследовательской организации или лаборатории вырабатывать собственные правила подсчета миелограммы и выводить средние значения, так как миелограммы животных из разных источников могут различаться, особенности интерпретации элементов костного мозга оператором также могут иметь место.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

1. Valli VE, Villeneuve DC, Reed B, et al. Evaluation of blood and bone marrow, rat. In: Jones TC, Ward JM, Mohr U, et al., eds. Hemopoietic System. Berlin: Springer-Verlag, 1990: 9–26.
2. Bolliger AP. Cytologic evaluation of bone marrow in rats: indications, methods, and normal morphology. *Vet Clin Pathol.* 2004; 33 (2): 58–67.
3. Travlos GS. Normal structure, function, and histology of the bone marrow. *Toxicol Pathol.* 2006; 34 (5): 548–565.
4. Travlos GS. Histopathology of bone marrow. *Toxicol Pathol.* 2006; 34 (5):566–598.

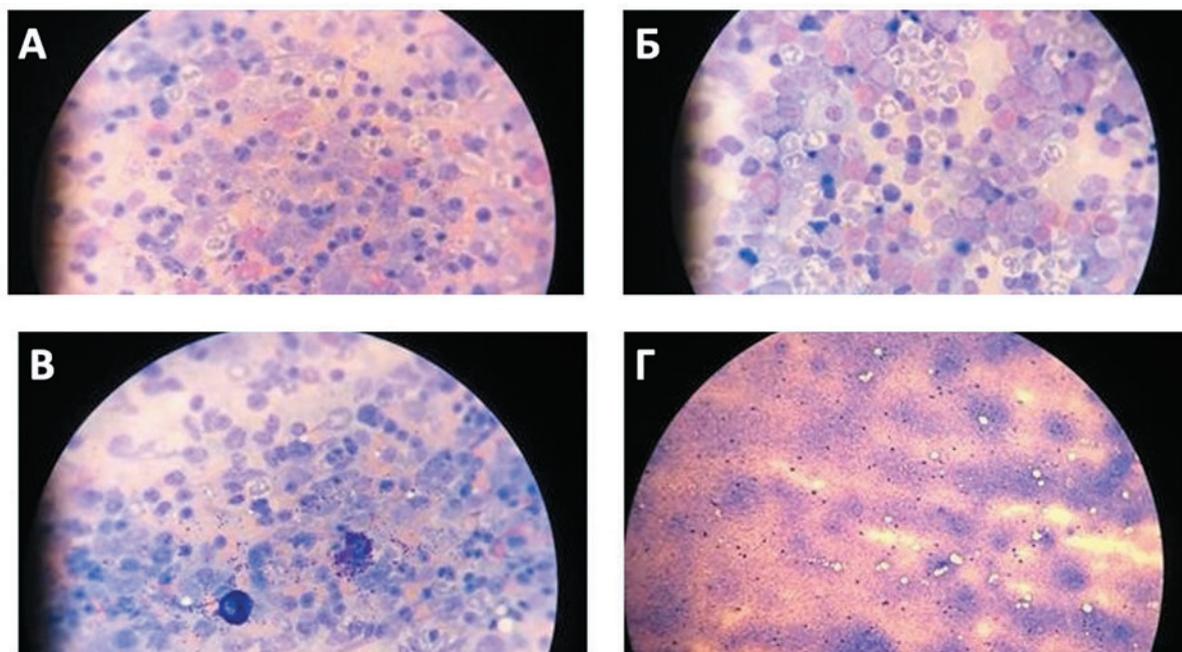


Рис. 9. Микрофотографии препаратов ККМ мышей (а), крыс (б), кроликов (в, г):

а, б — поля зрения с хорошим качеством мазка и окрашивания, заметны предшественники эозинофилов ($\times 1000$, иммерсия), в — тучные клетки в препарате костного мозга кролика ($\times 1000$, иммерсия), г — мегакариоциты в костном мозге кролика ($\times 100$, иммерсия)

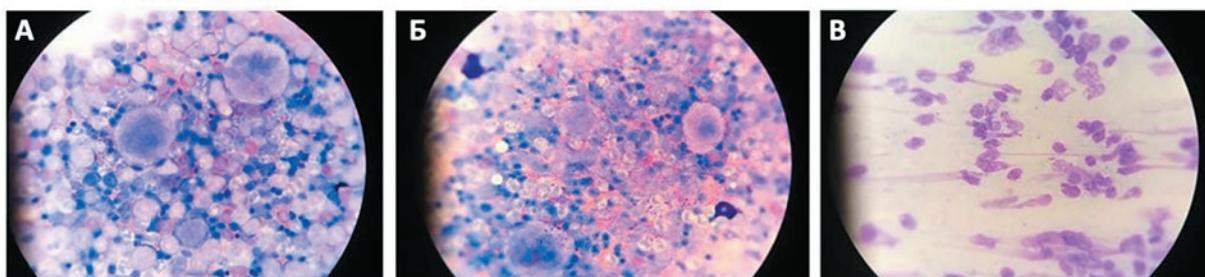


Рис. 10. Микрофотографии препаратов ККМ мышей (а), кроликов (б), крыс (в):

а, б — недостаточное окрашивание препарата в толстом слое ($\times 1000$, иммерсия), в — разрушенные клетки в результате приготовления мазка ($\times 1000$, иммерсия)

5. Reagan WJ, Irizarry-Rovira A, Poitout-Belissent F, et al. Best practices for evaluation of bone marrow in nonclinical toxicity studies. *Toxicol Pathol.* 2011; 39 (2): 435–448.

6. Makarov VG, Makarova MN. Physiological, biochemical and biometric indicators of the norm of experimental animals: reference book. SPB.: LEMA, 2013. 116 p. In Russian [Макаров В.Г., Макарова М.Н. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных: справочник. СПб.: ЛЕМА, 2013. 116 с.].

7. Endicott KM, Ott M. The normal myelogram in albino rats. *The Anatomical Record.* 1945: 61–69.

8. Hulse EV. Quantitative cell counts of the bone marrow and blood and their secular variations in the normal adult rat. *Acta Haematol.* 1964; 31: 50–63.

9. Sabin FR, Miller FR, Smithburn KC, et al. Changes in the bone marrow and blood cells of developing rabbits. *J Exp Med.* 1936; 64 (1): 97–120.

10. Dikovinova NV. The absolute number of cells in bone marrow and myelograms of normal rabbits. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine,* 1957: 1129–1132.

11. Chervenick PA, Boggs DR, Marsh JC, et al. Quantitative studies of blood and bone marrow neutrophils in normal mice. *Am J Physiol.* 1968; 215 (2): 353–360.

12. Matsumoto K, Futamura Y. Cell counts in peripheral blood and bone marrow of male CBA/N mice. *J Vet Med Sci.* 1995; 57 (4): 755–756.

13. Vorob'eva OV. Dynamics of the morphofunctional state of bone marrow cell-differons as a hematopoietic organ. *Zhurnal anatomii i gistopatologii=Journal of Anatomy and Histopathology.* 2017; 6 (2): 26–29. In Russian [Воробье-

Таблица 6. Процентное соотношение показателей миелиограмм относительно полученных нами значений у мышей

| Литературные источники | Chervenick P. A., et al. (1968) | Matsumoto K., et al. (1994) | | | | Воробьева О. В. (2017) | Min Yang, et al. (2013) | Endicott K. M., et al. (1950) | | M ± m, % | | |
|---------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|--------|--------|--------|------------------------|-------------------------|-------------------------------|------------|----------|--------|-------------|
| | | SCID | | | | | | C-57 | CFW Strain | | | |
| | | 1 мес. | 2 мес. | 7 мес. | 1 мес. | | | | | | 2 мес. | 7 мес. |
| Пол, возраст, линия животных | | | | | | | | | | | | |
| Предшественники эритроцитов | 56 | 111 | 68 | 88 | 116 | 98 | 61 | 85 | 75 | 90 | 80 | 84 ± 19 |
| Миелоциты и метамиелоциты | 90 | 94 | 194 | 145 | 57 | 113 | 153 | 40 | 37 | 90 | 115 | 102 ± 48 |
| Палочкоядерные и с/я нейтрофилы | 52 | 101 | 124 | 115 | 63 | 109 | 124 | 83 | 95 | 65 | 76 | 92 ± 25 |
| Предшественники эозинофилов | 1591 | 628 | 358 | 805 | 508 | 426 | 589 | 4000 | 1136 | 4545 | 3409 | 1636 ± 1569 |
| Моноциты | – | 971 | 677 | 656 | 407 | 585 | 421 | – | 4364 | – | – | 1154 ± 1428 |
| Лимфоциты | 204 | 51 | 23 | 30 | 149 | 60 | 65 | 60 | 113 | 130 | 122 | 92 ± 56 |
| Бластные клетки | – | – | – | – | – | – | – | 254 | – | 22 | 60 | 112 ± 124 |
| Индекс созревания нейтрофилов | 169 | 91 | 153 | 123 | 87 | 101 | 120 | 47 | 38 | 135,6 | 147 | 110 ± 42 |
| Соотношение Leu/Eg | 110 | 93 | 216 | 145 | 56 | 115 | 226 | 80 | 157 | 100 | 126 | 129 ± 53 |

ва О.В. Динамика морфофункционального состояния клеточных дифферонов костного мозга как органа кроветворения. Журнал анатомии и гистопатологии. 2017; 6 (2): 26–29].

14. Yang M, Büsche G, Ganser A., et al. Morphology and quantitative composition of hematopoietic cells in murine bone marrow and spleen of healthy subjects. *Ann Hematol.* 2013; 92 (5): 587–594.

15. Endicott KM, Gump H. Hemograms and myelograms of healthy female mice of C-57 brown and CFW strains. *Blood.* 1947; 1: 60–63.

Информация об авторах:

Тютин Ксения Владимировна, младший научный сотрудник группы фармакокинетики ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации»;

Гущин Ярослав Александрович, руководитель отдела гистологии и патоморфологии ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации»;

Макарова Марина Николаевна, д.м.н., заместитель директора по науке ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации»;

Макаров Валерий Геннадьевич, д.м.н., директор ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации».

Author information:

Tyutina Kseniya V., Junior Researcher of Pharmacokinetic Department Saint Petersburg Institute of Pharmacy;

Gushchin Yaroslav A., Head of the Department of Histology and Pathomorphology, pathomorphologist Saint Petersburg Institute of Pharmacy;

Makarova Marina N., Dr. Sc., Deputy Director for Science Saint Petersburg Institute of Pharmacy;

Makarov Valeriy G., Dr. Sc., Director of Saint Petersburg Institute of Pharmacy.