

УДК 611.36/.37.013

## ЗАКОНОМЕРНОСТИ ОРГАНОМЕТРИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ СОСТАВЛЯЮЩИХ ПАНКРЕАТОДУОДЕНАЛЬНОГО ОРГАНОКОМПЛЕКСА В ПЕРИНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ ОНТОГЕНЕЗА ЧЕЛОВЕКА

Ахтемийчук Ю.Т., Слободян О.М., Проняев Д.В.

**Резюме.** Используя современные и классические методы анатомического и статистического исследований с использованием комплекта лицензионного программного обеспечения проведен анализ динамики органометрических параметров двенадцатиперстной кишки и поджелудочной железы в перинатальном периоде онтогенеза, установлена их периодизация и особенности развития.

**Ключевые слова:** поджелудочная железа, двенадцатиперстная кишка, плод, человек.

UDC 611.36/.37.013

## THE CONSISTENT PATTERNS OF THE ORGANOMETRIC PARAMETERS FOR THE CONSTITUENT PARTS OF THE PANCREATODUODENAL ORGANOCOMPLEX DURING THE PERINATAL PERIOD OF HUMAN ONTOGENESIS

Akhtemijchuk Yu.T., Slobodjan O.M., Pronyaev D.V.

**Summary.** By using modern and classical methods of anatomical and statistical studies we using a set of morphometric analysis dynamic parameters of the duodenum and pancreas during the perinatal period of ontogenesis established fact that duodenum and pancreas have periods and features of their morphogenesis.

**Key words:** pancreas, duodenum, fetus, human.

Стаття надійшла 18.03 2011 р.

УДК 591.84:599.323.4

С.В.Бабак

## ЗМІНИ В СТРУКТУРІ СУДИННОГО РУСЛА ДОВГИХ КІСТОК ПРИ ЗНЯТТІ ОПОРНОГО НАВАНТАЖЕННЯ

Інститут зоології ім. І.І.Шмальгаузена НАН України (м. Київ)

Робота виконана згідно із науковою темою Інституту зоології НАН України (номер держ.реєстрації – № 0111U000153).

**Вступ.** Процеси утворення та функціонування кісткової тканини тісно пов'язані із розвитком в ній кровоносних судин, з процесами васкуляризації. Особливості кровопостачання є видоспецифічним процесом. Воно також залежить від способу локомоції, від віку, від типу кістки, місця її локалізації в організмі та від навантаження на неї. Недивлячись на те, що кістка не є органом, який має дуже велике кровопостачання, однак наявність в кістці червоного кісткового мозку вносить свою специфіку в будову її кровоносного русла. Частина кровоносних судин різних діаметрів локалізуються в кістці в системі поздовжніх (гаверсових) каналах та каналах, що їх сполучають (фолькманових) [2]. Між судинною мережею та каналами кістки виявлені структурні подібності [7]. Показано тісний функціональний зв'язок між остеогенезом та ангиогенезом, а також між ремоделюванням кістки та васкуляризацією кісток [3, 11]. Периваскулярні клітини, що входять до складу судин, при штучно створених дефектах відіграють більшу роль при регенерації стегнових кісток кроликів, ніж введені в цю область клітини МСК [12].

Дослідження судинної організації кісток та її адаптації до зміни навантаження на скелет є актуальною проблемою, вивчення якої дає основи для розуміння взаємодії між різними структурами кістки і вирішення питань, пов'язаних із профілактикою та лікуванням хвороб опорної системи людини [9].

**Мета дослідження** – вивчити деякі особливості структури кровоносного русла довгих кісток за умов зняття опорного навантаження.

**Об'єкт і методи дослідження.** Дослідження проводили на білих щурах (контрольна та дослідна групи). Тварини дослідної групи знаходились 28 днів в умовах модельованого розвантаження задніх кінцівок шляхом «випісування» за хвіст під кутом 35° (метод Morey-Holton, 1998) [8]. З біопробірок стегнових кісток щурів були виготовлені гістопрепарати, які фарбували гематоксилін-еозином. Під світловим мікроскопом вивчали морфологічні особливості судинних каналів та кровоносних судин компактною частини діяфізу стегнових кісток. На гістопрізах вимірювали діаметри і питомі площі просвітів цих структур (метод Автандилова, 1990) [1]. Статистичний матеріал обробляли з

використанням коефіцієнта Стьюдента ( $p < 0,05$ ) (програма Microsoft Excel).

**Результати досліджень та їх обговорення.** Дослідження гістологічних препаратів біопробірок компактною частини діяфізу стегнових кісток щурів, що знаходились в експериментальних умовах зняття опорного навантаження на задні кінцівки, показало зміни в структурі судинних каналів. Зокрема, на поперечних зрізах виявлено деформацію поздовжніх (гаверсових) каналів, у деяких з них форма наближалась до щілин. В окремих ділянках кісткової тканини виявлені зони нерегулярної будови, подібні за морфологічними ознаками до склеротичних ділянок.

Морфометричний аналіз судинних каналів компакти стегнових кісток показав, що у тварин обох груп ці канали мають діаметри від 7 до 51 мкм. Але у щурів зі зняттям опорного навантаження виявлено достовірне збільшення діаметру каналів ( $14,2 \pm 0,2$  мкм), порівняно із контрольною групою ( $12,9 \pm 0,2$  мкм). Причому частота зустрічальності каналів із діаметром 7-11 мкм зменшується, а частота зустрічальності каналів з діаметром 12-31 мкм збільшується, порівняно із контролем. Можна припустити, що найменші за діаметром канали при гіпокінезії розширюються і належать вже до інших числових розрядів. Питомою площею просвітів досліджуваних каналів також змінилась ( $0,190 \pm 0,02$  мкм<sup>2</sup>, порівняно із контролем –  $0,164 \pm 0,01$  мкм<sup>2</sup>).

Ремоделювання та регенерація кістки – це складний процес, що включає формування судин. В зв'язку з цим остеогенні фактори виступають в тісному зв'язку з факторами, що стимулюють ангиогенез [10]. Доведено позитивний зв'язок між КМБ-4 (кістковий морфогенетичний білок, що виявляється при відновленні кістки), судинним ендотеліальним фактором (FLT-1), який в комбінації забезпечує остеогенну активність. Під дією КМБ-4 та фактора росту судин, які були абсорбовані на поверхні полілактидних відбувається інтенсифікація остеогенного диференціювання стромальних клітин кісткового мозку [5].

Гістологічне дослідження діяфізу стегнових кісток щурів експериментальної групи показало структурні зміни у кровоносному руслі судин каналів кісток. Зокрема, зустрічається деформація кровоносних судин, яка часто відбувається внаслідок розриву сполучнотканинних пучків, якими кріпляться судини до поверхні каналів. Також зафіксовані окремі випадки судом кровоносних судин. В

деформованих судинах гаверсових та фолькманових каналів виявлені місця агрегації формених елементів крові. Такі скупчення щільно прилягають до стінок судин. На зовнішній поверхні кровоносних судин зустрічаються поодинокі клітини або ж невеликі скупчення малодиференційованих клітин із слабо вираженою диференціацією. Зазвичай, вони тісно контактують з поверхнею капіляра. Можна припустити, що такі модифікації в області судинно-клітинного комплексу є наслідком або змін в структурі ендотеліоцитів чи периваскулярних клітин, або обумовлені виходом на зовнішню поверхню судини формених елементів крові внаслідок збільшення просвітів між ендотеліоцитами.

Дослідження ряду авторів [6] показали, що під час поділу клітин ендотелія судин ще до завершення процесу розділу клітин є сполучний зв'язок між дочірніми клітинами. І таким чином, не порушується цілісність судинної стінки під час клітинного поділу. Сполучні комплекси з прилеглих ендотеліальних клітин формуються також по площині контактів спайності до завершення цитокінезу. Виходячи з цього, вихід вмісту кровоносних судин, у тому числі і формених елементів за межі судини виключається. Отже, можемо припустити, що зниження опорного навантаження на кістку впливає на щільність контактів клітин стінки судин, а також відбувається порушення контактів при поділі цих клітин.

Описані морфологічні зміни у структурі кровоносного русла кісткової тканини узгоджуються і з даними морфометричного аналізу кровоносного русла. Так, при дефіциті опорного навантаження на кінецькістки спостерігалось

достовірне зменшення діаметру судин в каналах ( $9,53 \pm 0,07$  мкм, порівняно із контролем –  $12,49 \pm 0,03$  мкм) та зменшення їх питомої площі ( $0,113 \pm 0,01$  мкм<sup>2</sup>, порівняно із контролем –  $0,159 \pm 0,02$  мкм<sup>2</sup>), що може свідчити про зниження кровопостачання в кістці.

Аналіз результатів МРТ губчастої та компактною частини довгих кісток у хворих на остеопороз [4] показує подібні зміни в структурі кісткового мозку та васкуляризації: порушення вертикальних та горизонтальних трабекул, наявність субхондральних часток жиру, аномальне положення судин кістки та ін.

**Висновки.** Зниження опорного навантаження на задні кінецькістки викликає ряд змін в структурі судинних каналів та кровоносних судин компактною речовини діафізів стегнових кісток: деформацію каналів та судин, достовірні відмінності їх морфометричних характеристик, зменшення кровонаповнення судин, окремі випадки судом кровоносних судин, агрегації формених елементів крові, вихід на зовнішню поверхню кровоносних судин клітин із видозміненою морфологією. Описані відхилення у стані судинного русла можуть бути причиною погіршення кровопостачання кісток.

**Перспектива подальших досліджень** впливу зняття опорного навантаження на скелет полягає у вивченні та виявленні змін у структурі та функціонуванні ендотеліоцитів мікроциркуляторного русла кісткової тканини, а також периваскулярних клітин, які відіграють важливу роль в гістогенезах, особливо в остеогенезі.

## Список літератури:

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия / Г.Г. Автандилов. – М.: Медицина, 1990. – 384 с.
2. Мажуга П.М. Функциональная морфология кровеносных сосудов конечностей человека и животных / П.М. Мажуга. – К.: Наукова думка, 1966. – 258 с.
3. Родионова Н.В. Функциональная морфология клеток в остеогенезе / Н.В. Родионова. – Киев: Наук. думка, 1989. – 186 с.
4. de Abreu MR. Bone marrow MR imaging findings in disuse osteoporosis / MR. de Abreu, M. Wessely, CB. Chung [et al.] // Skeletal Radiol. – 2011. – 40 (5). – P. 57-65.
5. Huang Y.C. Combined angiogenic and osteogenic factor delivery enhances bone marrow stromal cell-driven bone regeneration / Y.C. Huang, D. Kaigler, K.G. Rice [et al.] // J. Bone Miner Res. – 2005. – Vol. 20. – P.848–857.
6. Hunter W.L. Endothelial cell division in metaphyseal capillaries during endochondral bone formation in rats / W.L. Hunter, A.L. Arsenault // Anat Rec. 1990. – 227(3). – P.351-358.
7. Kobayashi S. Fine structure of cartilage canal and vascular buds in the rabbit vertebral endplate. Laboratory investigation / S. Kobayashi, H. Baba, K. Takeno [et al.] // J. Neurosurg Spine. – 2008. – 9(1). – P. 96-103.
8. Morini S. Contact Information Microvascular adaptation to growth in rat humeral head / S. Morini, L. Pannarale, D. Conti [et al.] // Anatomy and Embryology. – 2006. – 211(5). – P. 403-411.
9. Morey-Holton E.R. Hindlimb unloading of growing rats: a model for predicting skeletal changes during space flight / E.R. Morey-Holton, R.K. Globus // Bone. 1998. – 22. – P. 83-88.
10. Peng H. Synergistic enhancement of bone formation and healing by stem cell-expressed VEGF and bone morphogenetic protein-4 / H. Peng, V. Wright, A. Usas [et al.] // J. Clin. Invest. – 2002. – Vol. 110. – P.751–759.
11. Rodionova N.V. Changes of cell-vascular complex in zones of adaptive remodeling of the bone tissue under microgravity conditions / N.V. Rodionova, VS. Oganov // Adv Space Res. – 2003. – 32(8). – P. 1477-81.
12. Wang L. Osteogenesis and angiogenesis of tissue-engineered bone constructed by prevascularized  $\beta$ -tricalcium phosphate scaffold and mesenchymal stem cells / L. Wang, H. Fan, Z.Y. Zhang [et al.] // Biomaterials. – 2010. – 31(36). – P. 9452-61.

УДК 591.84:599.323.4

### ЗМІНИ В СТРУКТУРІ СУДИННОГО РУСЛА ДОВГИХ КІСТОК ПРИ ЗНЯТТІ ОПОРНОГО НАВАНТАЖЕННЯ

Бабак С.В.

**Резюме.** В умовах модельованого зняття опорного навантаження на задні кінецькістки щурів гістологічними дослідженнями виявлено зміни в структурі судинних каналів та кровоносного русла кісток, зокрема: деформацію каналів і судин, а також збільшення діаметру та питомої площі каналів; зменшення діаметру та питомої площі кровоносних судин; зменшення кровонаповнення судин. Відмічені випадки судом кровоносних судин. В деформованих судинах виявлені місця агрегації формених елементів крові. На зовнішній поверхні кровоносних судин зустрічаються поодинокі клітини або ж невеликі скупчення клітин із видозміненою морфологією.

**Ключові слова:** кровоносне русло довгих кісток, судинні канали кістки, зниження опорного навантаження.

УДК 591.84:599.323.4

### ИЗМЕНЕНИЯ В СТРУКТУРЕ СОСУДИСТОГО РУСЛА ДЛИННЫХ КОСТЕЙ ПРИ СНЯТИИ ОПОРНОЙ НАГРУЗКИ

Бабак С.В.

**Резюме.** В условиях моделированного снятия опорной нагрузки на задние конечности крыс гистологическими исследованиями обнаружены изменения в структуре сосудистых каналов и кровоносного русла костей, в частности: деформацию каналов и сосудов, а также увеличение диаметра и удельной площади каналов; уменьшение диаметра и удельной площади кровеносных сосудов; уменьшение кровенаполнения сосудов. Отмечены случаи спазмирования кровеносных сосудов. В деформированных сосудах обнаружены места агрегации форменных элементов крови. На внешней поверхности кровеносных сосудов встречаются отдельные клетки или же скопления клеток с видоизменённой морфологией.

**Ключевые слова:** кровеносное русло длинных костей, сосудистые каналы кости, снижение опорной нагрузки.

UDC 591.84:599.323.4

CHANGES IN THE STRUCTURE OF THE VASCULAR BED OF LONG BONES UNDER THE LOWERING OF A SUPPORT LOAD

Babak S.V.

**Summary.** In a model of a removal of a bearing burden from the posterior limbs of rats, histological studies revealed changes in the structure of vascular channels and circulatory bed in the bones, in particular, a deformation of channels and vessels and an increase in the diameter and specific area of the blood vessels and a reduction of blood filling of the vessels. Angiospasmms were noticed in some blood vessels. Sites of aggregation of formed elements of the blood were found in deformed vessels. Separate cells or cell aggregates having modified morphology were found on the outer surface of the blood vessels.

**Key words:** circulatory bed of long bones, vascular channels of bones, lowering of a support load.

Стаття надійшла 29.03.2011 р.

УДК 612.112.086.3:57.043

Л.А. Бабийчук, Р.К. Мигунова, В.П. Невзоров

## ОЦЕНКА УЛЬТРАСТРУКТУРЫ ЯДРОСОДЕРЖАЩИХ КЛЕТОК КОРДОВОЙ КРОВИ ДО И ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков)

Работа выполнялась в соответствии с научной темой: «Изучение механизмов структурно-функциональных изменений ядродержащих клеток кордовой крови и эритроцитов под влиянием экзо- и эндоцеллюлярных криопротекторов и низких температур»; государственный регистрационный номер темы: 0109U00278.

**Вступление.** В настоящее время кордовая кровь (КК) и полученные из нее препараты привлекают внимание все большего количества исследователей и клиницистов, в связи с высокой терапевтической эффективностью, обусловленной наличием в них прежде всего стволовых гемопоэтических клеток, а также различных ростовых, колониестимулирующих факторов и других биологически активных веществ [3, 6].

Широкое применение КК возможно только при наличии ее запасов, что привело к созданию банков КК, в которых образцы хранятся в жидком азоте при температуре -196°C в течение практически неограниченного времени [1].

Однако, учитывая небольшие объемы КК (в среднем, не более 100 мл), очень важным является как заготовка максимального количества крови, так и, особенно, полное выделение ядродержащих клеток (ЯСК) (в том числе и гемопоэтических) при сепарации с сохранением их качества, а также разработка новых и усовершенствования существующих технологий криоконсервирования.

Поскольку клиническая эффективность препаратов ЯСК КК, включающих стволовые гемопоэтические клетки, напрямую зависит от количества и структурно-функциональной полноценности клеток, необходимо проведение их комплексного тестирования после криоконсервирования.

Достаточно информативными методами оценки структурно-функционального состояния ЯСК является метод трансмиссионной электронной микроскопии [4], а также метод проточной цитофлуориметрии с использованием ДНК-красителя 7AAD для определения их жизнеспособности [2].

В связи с этим **целью данной работы** было изучение ультраструктурных характеристик и жизнеспособности ЯСК КК до и после криоконсервирования разработанными нами методами.

**Объект и методы исследования.** Сбор КК производили после получения информированного согласия у беременной, которая проходила тщательный дородовой скрининг на наличие противопоказаний к donorству КК. Эксфузию КК осуществляли закрытым способом в систему для забора крови из пупочной вены при естественных родах после рождения ребенка и отделения его от плаценты зажимом. Средний объем получаемой КК в одном образце составлял 80±20 мл.

Выделение фракции ЯСК из КК проводили методом седиментации в 6% растворе полиглюкина. В качестве

криопротектора использовали ДМСО в конечной концентрации 5%. Криоконсервирование клеток проводили в замораживателе фирмы Cryosan по специальной разработанной нами четырехэтапной программе [5]. Оттаивание проводили на водяной бане при 37-39°C.

Фенотипирование ЯСК КК, в том числе и гемопоэтических, до и после криоконсервирования, проводилось методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитометре FACS Calibur фирмы Becton Dickinson (BD) (США) с использованием реагентов BD по международному ISHAGE протоколу. Жизнеспособность ЯСК КК оценивали с помощью флуоресцентного ДНК красителя 7-AAD (BD), используя метод проточной цитофлуориметрии.

Для электронно-микроскопического исследования выделенные ЯСК фиксировались в 2.5%-м растворе глutarового альдегида на фосфатном буфере (pH 7,3-7,4) в течение 5-6 часов при температуре 4°C. После промывки в буферном растворе клетки переносились для дофиксации в 1%-ный раствор четырех окиси осмия на 3-4 часа. Дегидратацию проводили в спиртах возрастающей концентрации и ацетоне. После обезвоживания клетки заключали в смесь эпоксидных смол эпон-аралдит. Полимеризацию блоков осуществляли в термостате при температуре 60°C в течение двух суток.

Ультратонкие срезы изготавливались на ультрамикротоме УМТП-3М, монтировали их на электролитические сеточки и, после контрастирования цитратом свинца, исследовали с помощью электронного микроскопа ЭМВ-100БР при ускоряющем напряжении 75 кВ. Увеличение подбиралось адекватно целям исследования.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Проведенные электронно-микроскопические исследования ультраструктуры ЯСК КК после выделения полиглюкином показали, что клетки имели типичную субмикроскопическую организацию. Ядра занимали большую часть цитоплазмы. Ядерная мембрана умеренно разрыхлена, образовывала глубокие инвагинации. Перинуклеарные пространства не расширены. Ядерный хроматин частично конденсирован, его глыбки располагались равномерно по площади среза ядра. Между ними локализовался деконденсированный хроматин, имеющий мелкогранулярную структуру и среднюю электронную плотность. Цитоплазма содержала большое количество рибосом и полисом (**рис. 1**).

В цитоплазме выявлялись мелкие митохондрии, имеющие матрикс повышенной электронной плотности, содержащий единичные кристы. Цистерны эндоплазматической сети имели вид вакуолей, заполненных электронно-прозрачной субстанцией. Иногда встречались мелкие включения липидов. Цитоплазматическая мембрана имела разрыхленный вид и образовывала микроворсинки. Обнаруживались очаги лизиса и разрыхление плазматической мембраны (**рис. 2**).