

© Борута Н. В.

УДК 611.018.46+616-092.9

Борута Н. В.

СТРУКТУРНА ХАРАКТЕРИСТИКА КРОВОТВОРНОГО МІКРООТОЧЕННЯ ЧЕРВОНОГО КІСТКОВОГО МОЗКУ ЩУРІВ У НОРМІ

ВДНЗ України «Українська медична стоматологічна академія»

(м. Полтава)

boruta.nata@mail.ru

Робота є фрагментом НДР МОЗ «Експериментально-морфологічне вивчення дії трансплантатів кріоконсервованої плаценти та інших екзогенних чинників на морфофункціональний стан ряду внутрішніх органів», № державної реєстрації 0113U006185.

Вступ. Важливість існування кровотворного мікрооточення обумовлена локалізацією постембріонального гемопоезу тільки в спеціалізованому кровотворному органі, а саме в червоному кістковому мозку [3,6]. Кровотворне мікрооточення — це сукупність структур і локальних умов, необхідних і достатніх для підтримки кількісного та якісного складу клітин. Його морфологічним субстратом є строма кісткового мозку, яка, окрім опорної функції, відповідає за міграцію, проліферацію та диференціювання клітин червоного кісткового мозку [1,9].

Гемопоетична стовбутова клітина вільно циркулює в периферичній крові, але проліферує і диференціюється тільки в червоному кістковому мозку, мікрооточення якого забезпечує необхідні умови для цих процесів [10].

Новим напрямком в клінічній медицині вважають трансплантацію стромальних компонентів кісткового мозку. Трансплантація стромальних клітин, що синтезують гемопоетини, стимулятори жирових клітин та інгібітори фіброзної тканини, хворим зі злоякісними захворюваннями строми є науково обґрунтованою [2,8]. Вищенаведене свідчить про необхідність поширювати знання про вплив кровотворного мікрооточення на кровотворні стовбурові клітини крові.

Як відомо, до кровотворного мікрооточення кісткового мозку відносять ретикулярні клітини, які мають зірчасту форму. Ретикулярні волокна побудовані із колагену III типу, утворюють ніжнопетлисту ретикулярну сітку. Остеобласти, що входять до складу ендосту і здатні впливати на проліферацію гемопоетичних клітин, адвентіційні клітини — малодиференційовані, які супроводжують кровеносні судини. Жирові клітини (адипоцити) є невід'ємним компонентом червоного кісткового мозку. Ендотеліоцити вистеляють внутрішню поверхню кровеносних судин органу. Макрофаги острівців фагоцитують ядра, виштовхнуті еритробласти при дозріванні [1,9]. Всі ці структури, розвиваються в результаті дивергентного

диференціювання стромальної стовбурової клітини, і відіграють роль кровотворного мікрооточення для клітин крові, що розвиваються [10,11].

Мета дослідження — вивчення структурної організації кровотворного стромальних компонентів червоного кісткового мозку стегнової кістки щурів у нормі.

Об'єкт і методи дослідження. Матеріалом для гістологічних досліджень були фрагменти стегнової кістки статевозрілих безпородних білих щурів. Забір матеріалу для мікроскопічних досліджень проводили згідно загальноприйнятої методики [5,7]. При виконанні роботи проводили анатомічне препарування, морфометричне та мікроскопічне дослідження. Для вивчення морфології ретикулярних волокон використовували модифікований метод Гримальуса на напівтонких зрізах, та постановку ШИК-реакції [5,7].

Фрагменти стегнової кістки, розміром 0,5-1 см. Фіксували в 10% нейтральному розчині формаліну з наступною декальцинацією у розчині етилендіамінтетраакусної кислоти (ЕДТА) з дотриманням рН 7,4. Вплив дінатрієвої солі ЕДТА викликає розм'якшення фрагментів кісткової тканини, потім отримані декальциновані фрагменти стегнової кістки заклали в Епон-812 за загальноприйнятою методикою [5,7]. Отримані просочені Епоном-812 шматочки матеріалу поміщали в формочки та заливали смолою з метою отримання епоксидних шліфів. Напівтонкі зрізи виготовляли на ультрамикротомі Сумського ВО «Selmi» УМТП-7. Зрізи забарвлювали 1% розчином метиленового синього, поліхромним барвником та заклали в полістирол під покривні скельця і після полімеризації вивчали в світловому мікроскопі.

Морфометрію і мікрофотографування проводили за допомогою мікроскопу Biorex-3 BM-500T з цифровою мікрофотонасадкою DCM 900 з адаптованими для даних досліджень програмами.

Експеримент був проведений з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілях» (Страсбург, 1985), нормам біомедичної етики та відповідним Законам України, згідно з «Правилами використання лабораторних експериментальних тварин» (2006, додаток 4) і Гельсінською декларацією про гуманне відношення до тварин.

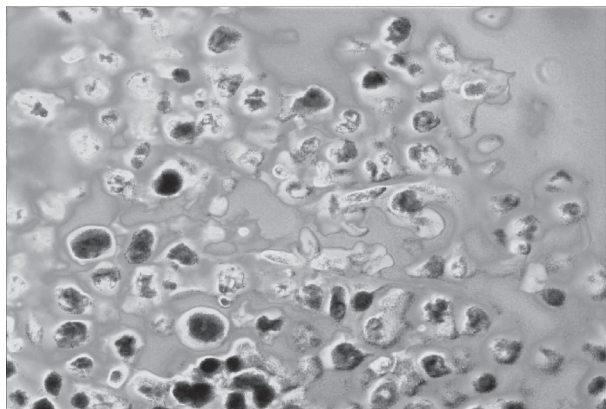


Рис. 1. Ендотеліальні клітини кровососного капіляру червоного кісткового мозку стегнової кістки щурів. Напівтонкий зріз. Забарвлення поліхромним барвником. Зб.: ок.10, об.100.

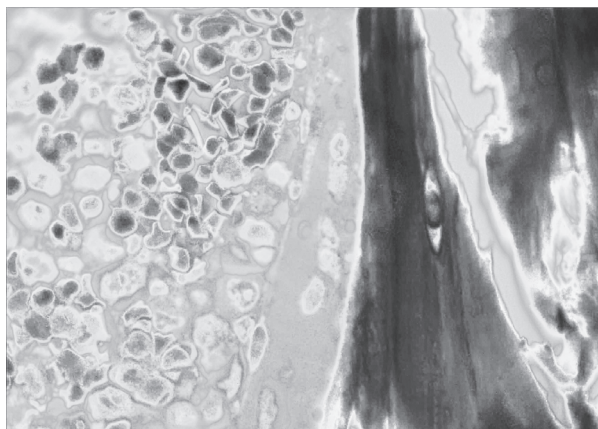


Рис. 2. Остеоцити розміщені в лакунах кісткових балок червоного кісткового мозку стегнової кістки щурів. Напівтонкий зріз. Забарвлення поліхромним барвником. Зб.: ок.10, об.100.

Результати досліджень та їх обговорення. При світлооптичному та електронно-мікроскопічному вивченні парафінових та напівтонких зрізів червоного кісткового мозку було виявлено скупчення клітин мієлоїдного і лімфоїдного рядів, які знаходяться на різних стадіях диференціювання. Морфометричними дослідженнями встановлено, що більшу частину червоного кісткового мозку займає мієлоїдна тканина. В полі зору були відмічені кісткові балки і жирові клітини, візуалізувались еритробластні острівці поряд з іншими клітинними структурами кісткового мозку. Синусоїдні гемокапіляри в більшості випадків були заповнені еритроцитами.

При імпрегнації напівтонких зрізів червоного кісткового мозку щурів контрольної групи, були ідентифіковані ретикулярні волокна діаметром 0,1-0,2 мкм, з помірними ступенем забарвлення, деякі із них мали потовщення та звивисту форму, з нерівними контурами. Імпрегновані волокна утворювали

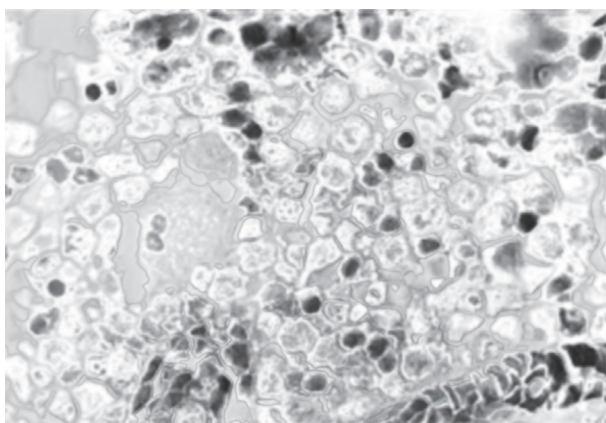


Рис. 3. Макрофаг еритробластного острівця червоного кісткового мозку стегнової кістки щурів. Напівтонкий зріз. Забарвлення поліхромним барвником. Зб.: ок.10, об.100.

сітку в якій розташовувалися гемопоетичні клітини кісткового мозку на різних стадіях диференціювання.

Кісткові трабекули утворювали грубу строму червоного кісткового мозку, в комірках якої був розташований червоний кістковий мозок з синусоїдними гемокапілярами із середнім діаметром $19,44 \pm 0,31$ мкм, які забезпечують проникнення зрілих клітин крові у загальний кровоток. Стінка їх була утворена ендотеліоцитами та переривчастою базальною мембраною. Паренхіма червоного кісткового мозку була представлена острівцями в яких виявлялись диферони гемопоетичних клітин на різних стадіях диференціювання.

Ендотеліальні клітини вистеляють судини кісткового мозку (**рис. 1**) і формують бар'єр між гемопоетичними клітинами і кров'ю, регулюють концентрацію клітин крові, здатні до скорочувань, і також сприяють проштовхуванню клітин крові по синусоїдних капілярах.

До остеогенних клітин червоного кісткового мозку відносять остеобласти та остеоцити, що моношаром розташовані на кісткових

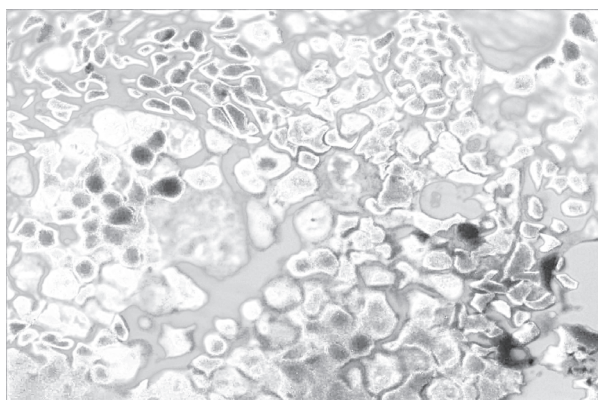


Рис. 4. Адипоцити червоного кісткового мозку стегнової кістки щурів. Напівтонкий зріз. Забарвлення поліхромним барвником. Зб.: ок.10, об.100.

трабекулах, також виявляються в складі ендосту та кісткомозкових порожнинах. На гістологічних препаратах кісткова тканина проявляє оксифілію (**рис. 2**), забарвлюється в яскраво червоний колір, в результаті дії поліхромного барвника. Остеобласти мають велике овальне ядро і відростки.

На напівтонких зрізах кісткового мозку, макрофаги візуалізувались, як клітини, які безпосередньо взаємодіють з клітинами еритробластного паростка, вони локалізовані в центрі еритробластного острівця і визначались, як правило, біля судин гемомікроциркуляторного русла. Форма макрофагів була мінливою, середній розмір складав $32,28 \pm 1,11$ мкм, ядра мали нерівний контур і ексцентричну локалізацію. Їх межі при світловій мікроскопії на великих збільшеннях не завжди чітко візуалізувались через велику кількість псевдоподій і пальцеподібних відростків, які відходили від клітини у різних напрямках. Псевдоподії забезпечують проникнення через стінки синусів, збирання та накопичення молекул заліза (трансферини) та передачу його клітинам еритробластного острівця (**рис. 3**).

Під час дослідження парафінових зрізів, були виявлені жирові клітини (адипоцити), які мали вигляд великих клітин з периферичним розташуванням ядра. На напівтонких зрізах, вони виявлялись як клітини повністю забарвлені в чорний колір, оскільки гістологічний матеріал піддавався дії осміевої кислоти в процесі ущільнення, яка і сприяла відповідному забарвленню жирових клітин червоного

кісткового мозку. Адипоцити візуалізувались поодинокі або групами. Їх присутність вважається звичайним явищем, а от відсутність вказує на гіперпластичний процес в паренхімі органу (**рис. 4**).

Відомо, що адвентиційні клітини, це один із різновидів ретикулярних клітин, які прилягають зовні до кровеносних судини, вкривають близько 50% поверхні синусоїдних капілярів, та утворюють зовнішню оболонку — адвентицію. Вони мають веретеноподібну форму, невелику кількість органел, овальне ядро. Під впливом гормону еритропоезу – еритропоетину, здійснюється їх скорочення, що сприяє міграції зрілих клітин крові в кровообіг.

Висновки. В результаті дослідження було встановлено, що гемопоетичні клітини розвиваються та існують завдяки тісній взаємодії з кістковою, сполучною (ретикулярною) тканинами, які формують разом з адипоцитами та адвентиційними клітинами мікрооточення кісткового мозку. Процес нормального кровотворення можливий лише при попередньо сформованому кровотворному мікрооточенні в червоному кістковому мозку щурів.

Перспективи подальших досліджень. В подальших дослідженнях планується вивчити структурної організації кровотворного мікрооточення червоного кісткового мозку стегової кістки щурів при гострому експериментальному запаленні очеревини, при одноразовому підшкірному введенні кріоконсервованої плаценти та дії кріоконсервованої плаценти на тлі гострого запалення очеревини.

Література

1. Афанасьев Ю.И. Гистология / Ю.И. Афанасьев, Н.А. Юрина, Е.Ф. Котовский [и др.]. – [5-е изд., перераб и доп.]. – М.: Медицина, 2002. – 744 с.
2. Волкова С.А. Основы клинической гематологии: учебное пособие / С.А. Волкова, Н.Н. Боровков. – Н. Новгород: Издательство Нижегородской гос. медицинской академии, 2013. – 400 с.
3. Воробьев А.И. Схема кроветворения / А.И. Воробьев, Н.И. Дризе, И.Л. Чертков // Пробл. генетол. и переливания крови. – 2005. – № 1. – С. 7-14.
4. Гаврилов О.К. Клетки костного мозга и периферической крови / О.К. Гаврилов, Г.И. Козинец, Н.Б. Черняк. – М.: Медицина, 1985. – 288 с.
5. Горальський Л.П. Основи гістологічної техніки і морфофункціональні методи досліджень у нормі та при патології / Л.П. Горальський, В.Т. Хомич, О.І. Кононський. – Житомир: Полісся, 2011. – 288 с.
6. Дризе Н.И. Стволовая кроветворная клетка. Гериатрическая гематология. Заболевания системы крови в старших возрастных группах / Н.И. Дризе, И.Л. Чертков. – М.: Медиум, 2011. – С. 11-20.
7. Карупу В.Я. Электронная микроскопия / В.Я. Карупу. – Киев: Вища школа, 1984. – 207 с.
8. Козинец Г.И. Клетки крови и костного мозга: Атлас / Г.И. Козинец, З.Г. Шишканова, Т.Г. Сарычева [и др.]. – М.: Медицинское информационное агентство, 2004. – 203 с.
9. Синусоидальные клетки печени и клетки костного мозга как компоненты единой функциональной системы регуляции восстановительного морфогенеза в здоровой и поврежденной печени / Н.А. Онищенко, А.В. Люндуп, Р.В. Деев [и др.] // Гены и клетки. – 2011. – Т. 6, вып. 2. – С. 12-15.
10. Chagastelles P.C. Biology and applications of mesenchymal stem cells / P.C. Chagastelles, N.B. Nardi, M. Camassola // Science Progress. – 2010. – Vol. 93 (2). – P. 113-128.
11. Orkin S.H. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell Biology / S.H. Orkin, L.I. Zon // Cell. – 2008. – № 132. – P. 631-644.

УДК 611.018.46+616-092.9

СТРУКТУРНА ХАРАКТЕРИСТИКА КРОВОТВОРНОГО МІКРООТОЧЕННЯ ЧЕРВОНОГО КІСТКОВОГО МОЗКУ ЩУРІВ У НОРМІ

Борута Н. В.

Резюме. Метою роботи було вивчення структурної організації кровотворних стромальних компонентів червоного кісткового мозку стегової кістки щурів у нормі. Матеріалом для гістологічних досліджень були фрагменти стегової кістки статевозрілих безпородних білих щурів. В результаті світлооптичного та електронно-мікроскопічного вивчення парафінових та напівтонких зрізів червоного кісткового мозку було виявлено скупчення клітин мієлоїдного і лімфоїдного рядів, які знаходяться на різних стадіях

диференціювання. Морфометричними дослідженнями встановлено, що більшу частину червоного кісткового мозку займає міелоїдна тканина. В полі зору були відмічені кісткові балки і жирові клітини, візуалізувались еритробластні островці поряд з іншими клітинними структурами кісткового мозку.

Ключові слова: мікрооточення, еритробластні островці, червоний кістковий мозок, строма.

УДК 611.018.46+616-092.9

СТРУКТУРНА ХАРАКТЕРИСТИКА КРОВЕТВОРНОГО МИКРООКРУЖЕННЯ КРАСНОГО КОСТНОГО МОЗГА КРЫС В НОРМЕ

Борута Н. В.

Резюме. Целью работы было изучение структурной организации кроветворных стромальных компонентов красного костного мозга бедренной кости крыс в норме. Материалом для гистологических исследований были фрагменты бедренной кости половозрелых беспородных белых крыс. В результате светооптического и электронно-микроскопического изучения парафиновых и полутонких срезов красного костного мозга было выявлено скопление клеток миелоидного и лимфоидного рядов, которые находятся на разных стадиях дифференцировки. Морфометрическими исследованиями было установлено, что большую часть красного костного мозга занимает миелоидная ткань. В поле зрения были отмечены костные балки и жировые клетки, визуализировались эритробластные островки рядом с другими клеточными структурами костного мозга.

Ключевые слова: микроокружение, эритробластные островки, красный костный мозг, строма.

UDC 611.018.46+616-092.9

STRUCTURAL CHARACTERISTICS OF THE HEMATOPOIETIC MICROENVIRONMENT RED BONE MARROW OF RATS IN NORM

Boruta N. V.

Abstract. The aim was to study the structural components of hemopoietic stromal bone marrow red rat femur normal.

The material for histological examination were fragments of femur of mature white rats. Collecting the material for microscopic research conducted by conventional methods.

To study the morphology of the reticular fibers using a modified method for Hrimelius semithing sections and staging PAS-reaction. Fragments of the femur, the size of 0.5-1 cm. Fixed in 10% neutral formalin solution followed decalcination and embedded in Epone-812.

Morphometric study found that most of the red bone marrow takes myeloid tissue. In the field of beams were marked bone and fat cells visualized erythroblastic islands along with other cellular structure of the bone marrow. Sinusoidal hemocapillaries in most cases were filled with erythrocytes.

When impregnation semithing slices of red bone marrow of rats in the control group were identified reticular fiber diameter of 0.1-0.2 microns, with a moderate degree of color, some of them had thickened and winding shape with irregular contours.

Impregnated fibers form a mesh which housed the bone marrow hematopoietic cells in various stages of differentiation.

Bone trabeculae formed a rough stroma of red bone marrow cells into which was placed a red bone marrow with sinusoidal hemocapillaries with an average diameter of $19,44 \pm 0,31$ mm.

Parenchyma of red bone marrow was submitted islands which are identified dyferony hematopoietic cells in various stages of differentiation.

In semithing sections of bone marrow macrophages visualized how cells interact directly with cells erythroblastic sprout, they are located in the center of the island and determined erythroblastic usually at hemomicrovascular bed. Form of the macrophages was variable, the average was $32,28 \pm 1,11$ mm, core have uneven contour and eccentric localization. Their limits under light microscopy at high magnification is not always clear due to the amount visualized psevdopodiy finger-like shape and processes that depart from the cells in different ways. Pseudo ensure penetration through the wall of the sinuses, collection and storage of molecules of iron (transferrin) and transfer it to cells erythroblastic island.

During the study, paraffin sections were detected fat cells (adipocytes), which had the appearance of large cells of peripheral location of the kernel placed singly or in groups.

Adventitial had fusiform cells, a small number of organelles oval nucleus. The study found that hematopoietic cells develop and are due to close cooperation with bone, connective (reticular) tissues that form with them adventytsiy adipocytes and cells of the bone marrow microenvironment. The process of normal blood formation is possible only under pre-hematopoietic microenvironment formed in the red bone marrow of rat.

Keywords: microenvironment, erythroblastni islands, red bone marrow stroma.

Рецензент – проф. Єрошенко Г. А.

Стаття надійшла 12.05.2016 року