

УДК 636.21 (611 – 018. 46 + 611 – 018. 4)

Гаврилін П.М., доктор ветеринарних наук, професор
Сосоний С.В., асистент[©] (E-mail: plppm@ua.fm)
Дніпропетровський державний аграрний університет

ОСОБЛИВОСТІ ГІСТО- ТА ЦИТОГЕНЕЗУ КІСТКОВОГО МОЗКУ В ПЛОДІВ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Визначені закономірності пренатального гісто- та цитогенезу кісткового мозку (КМ) в кістках осьового скелета та скелета кінцівок великої рогатої худоби (ВРХ). Встановлено, що в 2-місячних плодів ВРХ повний комплекс морфологічних ознак функції універсального гемопоезу виявляється тільки в центральних зонах основних осередків окостеніння скелета. Вікові зміни гісто- та цитоархітекτονіки кісткового мозку ВРХ протягом плідного періоду характеризуються поетапною «передислокацією» кровотворного КМ дифузно-острівцевої структури з центру осередків в напрямку зон росту з розвитком ознак деградації гемопоетичного КМ в центральних зонах основних ООК скелета кінцівок. Розвиток ООК супроводжується втратою кістковим мозком в більшості з них морфологічної полярності внаслідок формування чисельних кровотворних острівців в зонах росту на основні остеогенної форми КМ. З'ясовано, що ознаки структурно-функціональної гетерогенності КМ та чітко виражена стадійність його вікової трансформації більш характерні для основних ООК ніж додаткових.

Ключові слова: *плоди великої рогатої худоби, кістковий мозок, кровотворні клітини, кровотворне мікрооточення, морфогенез.*

Вступ. Наслідком широкого застосування, в останні десятиріччя в гематології та імунології, молекулярних методів дослідження стало розкриття ряду нових механізмів і принципів реалізації універсального гемопоезу та імуногенезу в ссавців [2, 4, 5, 6]. З використанням клітинних культур та лабораторних тварин – моделей доведено, що в КМ ссавців утворюються і «дозрівають» практично всі види кровотворних і імунокомпетентних клітин, в тому числі і В-лімфоцити, які у птиці остаточно диференціюються в клоакальній сумці [4, 6]. Встановлено також, що острівцевий механізм «дозрівання» еритро- і гранулоцитів в КМ ссавців принципово, відрізняється від В-лімфоцитопоезу, який відбувається в процесі міграції і послідовної взаємодії попередників В-лімфоцитів з різними типами клітин строми КМ, аналогічно селекції Т-лімфоцитів в тимусі.

Можна припустити наявність безпосередньої взаємодії між ступенем розвитку багатокomпонентної системи кровотворного мікрооточення і ефективності функції універсального гемопоезу в скелеті ссавців, яка втрачається в міру «ожиріння» строми КМ, в результаті чого «спектр» кровотворення звужується до еритро- і гранулоцитопоезу.

Таким чином, імовірно, червоний КМ у ссавців, на різних стадіях свого розвитку, є компонентом скелета вкрай неоднорідним як в структурному, так і в функціональному відношенні з різними остеогенним та кровотворним потенціалом.

Зміни уяви про основні аспекти гемопоетичної функції кісткового мозку потребує суттєвих переглядів ряду створених принципів його морфогенезу і особливо, на ранніх стадіях формування скелета, коли процеси остеогістогенезу і кровотворення найбільш тісно взаємопов'язані, а спектр морфо-функціональних форм КМ є найбільш численним.

Дослідження особливостей гісто- та цитогенезу кісткового мозку у ссавців в пренатальному онтогенезі, із врахуванням сучасних концепцій універсального гемопоезу і імуногенезу, буде сприяти більш глибокому розумінню причин і патогенезу хвороб новонароджених та молодих тварин, які обумовлені порушенням процесу кістковоутворення, недостатністю механізмів неспецифічної і імунологічної реактивності.

Метою досліджень було визначити особливості гісто- та цитогенезу кісткового мозку в плодів великої рогатої худоби у взаємозв'язку з процесами енхдрального окостеніння скелета.

Матеріал і методи. Дослідження проведено в лабораторії гістології, імуноцитохімії та патоморфології НДЦ біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК Дніпропетровського державного аграрного університету. Досліджували кісткові органи осьового скелета (нижньощелепна кістка, 5-грудний хребець, 1, 5 – хвостові хребці, 5 реберна кістка та 3 сегмент груднини) та скелета кінцівок (плечова, плеснева кістки 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8- та 9-місячних плодів ВРХ, по 6 кожного віку).

Заморожені та парафінові гістозрізи цілих кісток та їх окремих ділянок, товщиною 10-30 мкм, забарвлювали гематоксиліном і еозином, азур II еозином, суданом III. Особливості гісто- та цитоархітектоніки КМ досліджували за допомогою мікроскопів МБС-10, Olimpus СН 20, СХ 41. Використовуючи методику «крапкового підрахунку» Г.Г. Автандилова [1], визначали відносну площу (ВП) клітинних компонентів кісткового мозку (остеогенні, кровотворні, стромальні та жирові клітини) в основних та додаткових осередках окостеніння (ООК). Клітинний склад кісткового мозку досліджували окремо у зонах первинної та вторинної губчастої кісткової речовини основних (діафізарних) та додаткових (епіфізарних, апофізарних) осередків окостеніння. Зону вторинної губчастої кісткової речовини у діафізарних ООК трубчастих кісток кінцівок додатково поділяли на проксимальну, дистальну та середню ділянки. Підрахунок клітин КМ проводили в 5 гістопрепаратах кожної кістки, або її фрагменти, в 3-5 полях зору мікроскопа.

Відносну площу клітинних компонентів КМ підраховували за формулою:

$$S_{\text{відн.}} = P_k/P_z \times 100 \%,$$

Де $S_{\text{відн.}}$ – відносна площа відповідних клітинних компонентів КМ, %

P_k – кількість крапок, що потрапили на відповідні клітинні компоненти КМ.

Рз – загальна кількість крапок, що потрапили на всі клітини кісткового мозку у відповідній зоні ООК.

Статистичну обробку цифрових даних проводили за допомогою комп'ютерної програми.

Результати дослідження. Встановлено, що в скелеті 2-місячних плодів ВРХ кровотворна «територія» знаходиться в межах виключно основних ООК, додаткові ООК в досліджуваних кістках плодів не виявляються. Характерно, що КМ в осередках представлений тільки двома його структурно-функціональними формами – остеобластичним (остеогенним) та кровотворним (гемопоетичним), співвідношення яких безпосередньо визначається масштабами розвитку осередків. КМ 2-місячних плодів ВРХ має чітко виражену зональну структуру, остеобластична його форма локалізується у вічках первинної губчастої речовини, в зонах росту, кровотворна – в центральних ділянках, в зоні вторинної губчастої кісткової речовини.

Основними клітинами остеобластичного КМ 2-місячних плодів ВРХ є остеогенні клітини, ВП яких коливається в різних ООК від 75 % до 82 % (табл. 1, 2), що визначається ступенем розвитку (фізіологічної гіпертрофії та гіперплазії) остеобластичного шару ендосту. ВП стромальних клітин у зонах росту ООК 2-місячних плодів ВРХ не перевищує 18-26 %. Позаклітинні структури остеобластичного КМ, при цьому, представлені переважно колагеновими волокнами, серед яких виявляються поодинокі ретикулярні.

У гемопоетичному КМ 2-місячних плодів ВРХ переважають кровотворні клітини (ВП – 54 – 84,5 %), відносна кількість яких зростає в напрямку центру ООК. Якщо на периферії осередків гемопоетичний КМ має чітко виражену острівцеву структуру, то в їх центральних зонах дифузно-острівцеву, кровотворні клітини в якій розташовані у вигляді суцільного шару із ущільненнями в місцях скупчення кровотворних острівців. ВП остеогенних клітин у гемопоетичному КМ значно менше ніж у остеобластичному, не більше 36 %. Їх відносна кількість зростає в центробіжному напрямку. Така ж тенденція характерна й для стромальних клітин, ВП яких в ООК скелета 2-місячних плодів ВРХ коливається від 6 до 22 %. Стоншення остеобластичного шару ендосту у кістковомозкових вічках, що містять червоний кістковий мозок, супроводжується розвитком характерної для «мієлоїдної» тканини строми, що складається з комплексу ретикулярних клітин, макрофагів з окремими фібробластами та концентрується між ендостом та синусоїдними капілярами.

Жирові клітини в КМ 2-місячних плодів ВРХ, навіть у найбільш розвинених ООК, не виявляються.

Чітко виражена зональна структура КМ у більшості основних ООК скелета в плодів ВРХ зберігається до 6-місячного віку. В останню третину плідного періоду внаслідок інтенсивного розвитку кровотворних клітин в зонах росту ООК, що супроводжується трансформацією остеогенного КМ в гемопоетичний, кровотворний КМ розповсюджується на всю площу осередків. При цьому на периферії ООК він має острівцеву, а в їх центральних зонах – дифузно-острівцеву структуру.

Таблиця 1

Динаміка відносної площі клітинних компонентів кісткового мозку в 3-му сегменті груднини плодів ВРХ, %

| | Клітини | Вік, місяці | | | | | | | |
|---|-------------------------|---------------|---------------|-----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|-----------------|
| | | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| Зона первинної губчастої кісткової речовини | остеогенні | 80,8± 1,4 | 70,3± 3,1 | 69,9± 3,6 | 71,5± 2,8 | 67,2± 3,0 | 67,02± 2,4 | 55,98± 2,2 | 54,62± 2,8** |
| | крово- творні | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | жирові | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | стромальні ¹ | 19,1± 1,4 | 29,6± 3,1 | 30,0± 3,6 | 28,4± 2,8 | 32,7± 2,8 | 26,72± 2,7 | 35,8± 2,6 | 32,26± 1,9** |
| Зона вторинної губчастої кісткової речовини | остеогенні | 14,5± 1,2 | 22,0± 1,0 | 17,3± 0,7 | 20,0± 0,7* | 16,0± 1,9 | 13,08± 1,8 | 11,4± 1,0 | 6,72± 0,9 |
| | крово- творні | 77,63± 1,8 | 70,00± 2,8 | 70,85± 1,0 | 75,63± 1,0 | 79,24± 3,8 | 80,55± 2,4 | 81,38± 1,7 | 82,78± 0,9* |
| | жирові | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,56± 0,89 |
| | стромальні ¹ | 7,78± 0,6 | 7,95± 2,3 | 11,75± 1,0** | 4,28± 0,5 | 4,70± 1,0 | 6,36± 1,1 | 7,17± 0,8 | 8,94± 0,5** |

P<0,05*, P<0,01**, P<0,001***

¹Ретикулярні, ендотеліальні клітини, макрофаги, фібробласти

Протягом всього плідного періоду зональна структура основних ООК в плодів ВРХ зберігається лише в окремих хвостових хребцях та груднині. В скелеті хвоста це, імовірно, пов'язано з затримкою процесу осифікації хвостових хребців та, відповідно, розвитку гемопоетичного КМ, а в сегментах груднини, навпаки, посиленням енхондраальним остеогістогенезом з відповідним розвитком структур, що його забезпечують.

Розвиток червоного КМ в основних ООК скелета плодів ВРХ супроводжується, відповідно, збільшенням ВП кровотворних клітин, особливо в центральних зонах ООК кісток осьового скелета (див. табл. 1, 2). ВП остеогенних клітин, при цьому, має тенденцію до зниження в усіх без винятку основних ООК, що на відміну від відповідного показника кровотворних клітин, більш виражено в їх центрах, а найменш на периферії, в зонах росту.

Характерно, що динаміка відносної кількості стромальних клітин в основних ООК плодів ВРХ до 6-місячного віку позитивно координувана з відповідними показниками кровотворних клітин та негативно – остеогенних.

Таблиця 2

**Динаміка відносної площі клітинних компонентів кісткового мозку
в ООК стегнової кістки плодів ВРХ, %**

а). в основному (діафізарному ООК)

| Вік | Клітини | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|---|---------|---|-----------|------------|-----------|------------|------------|-------------|--------------|
| | | КМ первинної губчастої кісткової речовини | | | | | | | |
| остеогенні | | 79,10±2,7 | 76,61±1,2 | 73,60±2,1* | 74,35±2,7 | 68,82±1,2 | 66,55±2,1 | 56,81±1,4** | 50,54±0,8*** |
| кровотворні | | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 5,22±0,4 | 9,30±1,3 | 14,51±1,2** |
| жирові | | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| стромальні ¹ | | 20,90±2,7 | 23,39±2,0 | 26,40±2,1 | 25,65±2,7 | 31,18±1,2 | 28,24±2,3* | 33,89±0,3 | 34,94±0,9*** |
| КМ вторинної губчастої кісткової речовини (проксимальна та дистальна ділянки діафізаречовини) | | | | | | | | | |
| остеогенні | | 29,25±1,1 | 23,58±2,6 | 14,82±0,9 | 10,44±1,0 | 7,54±0,5** | 15,32±0,5 | 11,35±0,8 | 8,27±0,7 |
| кровотворні | | 60,01±1,6 | 63,00±3,4 | 70,37±1,8 | 81,52±1,5 | 83,82±0,5 | 74,50±0,8 | 74,56±1,0 | 73,57±1,3*** |
| жирові | | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,69±0,2 | 4,46±0,4 | 8,75±0,6** |
| стромальні | | 10,74±1,9 | 13,42±1,4 | 14,82±0,9 | 8,04±0,9 | 8,64±0,2 | 10,18±1,0 | 9,63±0,5 | 9,41±0,2 |
| КМ вторинної губчастої кісткової речовини (проксимальна та дистальна ділянки діафіза) | | | | | | | | | |
| остеогенні | | 31,27±1,4 | 24,33±1,9 | 11,00±1,4 | 3,55±0,4 | 2,65±0,3 | 4,50±0,2 | 3,87±0,2 | 3,38±0,2** |
| кровотворні | | 61,65±0,6 | 63,41±2,0 | 76,06±0,9 | 85,85±0,7 | 84,68±0,3 | 86,63±0,1 | 74,70±0,7 | 65,11±1,3*** |
| жирові | | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 3,67±0,4 | 4,92±0,5 | 18,02±0,4 | 28,53±1,5*** |
| стромальні ¹ | | 7,09±1,2 | 9,86±0,9 | 11,63±0,4 | 7,76±0,7 | 8,99±0,5 | 3,95±0,3 | 3,40±0,2 | 2,97±0,2 |

б). у додатковому (епіфізарному проксимальному) ООК

| | | | | | | | | | | |
|---|--|-------------|---|---|---|-----------|-------------|------------|-------------|------------|
| Зона первинної губчастої кісткової речовини | | остеогенні | - | - | - | 82,12±1,9 | 76,27±1,4 | 77,30±1,6 | 67,34±2,4* | 63,31±1,8 |
| | | кровотворні | - | - | - | 0,00 | 0,00 | 14,99±1,2* | 28,93±1,6** | 30,21±1,7* |
| | | жирові | - | - | - | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | | стромальні | - | - | - | 36,97±1,5 | 22,93±1,4* | 28,35±1,1 | 3,77±2,0* | 6,48±1,4 |
| Зона вторинної губчастої кісткової речовини | | остеогенні | - | - | - | 8,50±0,4 | 5,28±0,7 | 7,56±1,2* | 3,44±0,5** | 2,45±0,4 |
| | | кровотворні | - | - | - | 87,39±1,4 | 74,29±1,5 | 68,35±1,5 | 65,38±2,4 | 69,55±1,4* |
| | | жирові | - | - | - | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | | стромальні | - | - | - | 4,11±1,6 | 20,03±0,4** | 24,09±1,4 | 31,18±1,4 | 28,00±1,5 |

$P < 0,05^*$, $P < 0,01^{**}$, $P < 0,001^{***}$

Жирові клітини в основних ООК осового скелета у ВРХ протягом всього плідного періоду практично не виявляються. Незначні скупчення адипоцитів, ВП яких не перевищує 1,5 %, характерні тільки для ООК груднини 9-місячних плодів (див. табл. 1). В основних ООК кісток скелета кінцівок скупчення жирових клітин ресструється, починаючи з 6-місячного віку. При цьому вектор їх концентрації спрямований до центру ООК або середньої ділянки діафіза. В результаті в 9-місячних плодів ВП адипоцитів у КМ проксимальних (або дистальних) ділянок діафізів не перевищує 3-9 %, тоді як у середніх досягає майже 30 %. На тлі розвитку в КМ адипоцитів, ВП всіх інших клітин зменшується відповідно до масштабів його «ожиріння». При цьому

гемопоетичний КМ набуває переважно острівцевої структури, але на відміну від зон росту, цей процес супроводжується вираженою деградацією строми мозку, як її клітинних так і волокнистих компонентів.

Додаткові ООК (епі- та апофізарні) в скелеті кінцівок плодів ВРХ виявляються починаючи з 5-місячного віку, а в досліджуваних кістках осьового скелета дещо пізніше, наприкінці плідного періоду (у 8 - 9- місячних плодів). На ранніх стадіях формування КМ додаткових ООК представлений виключно остеогенною формою, а початок розвитку в КМ кровотворних клітин відбувається на тлі формування вторинної губчастої кісткової речовини в центральній зоні ООК. Характерно, що структурно-функціональна гетерогенність КМ в додаткових ООК плодів, на відміну основних, зберігається менш тривалий час, протягом 2-3 місяців від моменту утворення, за винятком епіфіза плесневої кістки, в зоні росту якого кровотворні клітини не виявляються до кінця плідного періоду. Слід відзначити, що процес «проникнення» кровотворних клітин у зони росту додаткових ООК скелета плодів ВРХ значною мірою залежить від остеогенного потенціалу того чи іншого осередка. В незначних за розмірами та масштабами осифікації ООК зональна структура КМ слабо виражена, а процеси трансформації КМ мають нетиповий прискорений характер.

В цілому кількісна динаміка клітин КМ в додаткових осередках скелета плодів ВРХ аналогічна змінам його клітинного складу в основних ООК протягом першої та другої третини плідного періоду (до 6-місячного віку). Але темпи зростання ВП клітин строми на тлі збільшення відносної кількості кровотворних клітин та, відповідно, зменшення остеогенних, в додаткових ООК дещо нижче ніж в основних, що може вказувати на більш низький кровотворний потенціал додаткових ООК порівняно з основними. Жирові клітини в кістковому мозку додаткових ООК в ВРХ протягом плідного періоду не виявляються.

Висновки. Основними структурно-функціональними характеристиками кісткового мозку ВРХ на початку плідного періоду є: виключна локалізація в губчастій кістковій речовині основних осередків окостеніння скелета; чітко виражена морфологічна гетерогенність з розподілом на периферичну остеогенну та центральну – гемопоетичну форми: зональна структура кровотворного КМ з наявністю острівцевих та дифузно-острівцевих топографічно відокремлених ділянок. Дифузно-острівцева форма КМ в плодів ВРХ відрізняється найбільш розвиненим комплексом морфологічних ознак функції універсального гемопоезу та специфічним змінним характером локалізації в межах осередків окостеніння, що виявляється центробіжною її «міграцією» в напрямку зон росту по мірі їх розвитку, що більш виражено в основних ООК ніж додаткових.

Морфологічні ознаки деградації кровотворного КМ у ВРХ з'являються на початку останньої третини плідного періоду в центральних зонах найбільш розвинених ООК скелета кінцівок і характеризується інтенсивним розвитком жирових клітин у строми гемопоетичного КМ з набуттям ним острівцевої структури.

Кістковий мозок плодів ВРХ протягом плідного періоду має чітко виражені морфологічні ознаки остеогенного та кровотворного потенціалу з

протилежно спрямованими векторами їх розвитку в межах осередків та різною інтенсивністю прояву як в різних за масштабами осифікації ООК, так й на різних стадіях їх розвитку.

Провідна роль в реалізації функції універсального гемопоезу в ВРХ в пренатальному періоді онтогенезу належить основним ООК скелета тулуба та кінцівок, виражені морфологічні ознаки кровотворення в окремих додаткових ООК з'являються тільки в останню третину плідного періоду.

Література

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. – М.: Медицина, 1990. – 384 с.
2. Владимирская Е.Б. Стромальное микроокружение кроветворного костного мозга: состав и функции // Вопросы гематологии, онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2006. Т. 5. - № 4. – С. 29 – 32.
3. Воробьев А.И. Руководство по гематологии / А.И. Воробьев. – М.: Медицина, 1985. – Т. – 447 с.; Т. 2. – 367 с.
4. Ройт А. Иммунология: пер. с англ. А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл. – М.: Мир, 2000. – 592 с.
5. Черткоа И.Л. как обеспечивается поддержание кроветворной системы / И.Л. Чертков, Н.И. Дризе // Гематология и трансфузиология. – 1998. – Т. 43. - № 4. – С. 3 – 9.
6. Bianco P. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology and potential applications / P. Bianco, M. Riminucci, S. Gronthos, P.G. Robey // Stem Cells. – 2001. – vol. 19. – P. 130 – 192.
7. Gallagher R.B. To B a not to B: that is the question / R.B. Gallagher, D.B. Osmand // Immunology Today. – 1991. V. 12. – P. 1-3.

Summary

Sosonniy S.V., Gavrilin P.N.

The features of forming of clusters of the gisto- and cytogenesis of marrow are in skeleton of bovine fetuses.

Conformities to the law of bovine fetuses gisto- and cytogenesis of marrow are in the bones of axial skeleton and skeleton of extremities of bovine fetuses. It is set that at a bovine fetuses at the beginning of prenatal ontogenesis the complete complex of morphological signs of function of universal gemopoesis appears only in the central areas of basic cells of ossification of skeleton. Age-old changes of gisto- and cytogenesis of marrow of bovine fetuses during a prenatal ontogenesis stage-by-stage of read marrow of structure is characterized from the center of cells in direction of of growth with development of signs of degradation of read marrow in the central of in skeleton of and loss marrow in most cells of morphological polarity as a result of forming in the of growth on the basic osteoblasts forms of marrow and the stage of his transformation is expressly expressed more characteristic for basic in skeleton than additional.

Стаття надійшла до редакції 8.04.2010