

Л.Р.Шаймарданова

Крымский государственный
медицинский университет
им. С.И.Георгиевского

Ключевые слова: костный
мозг, спинномозговая жид-
кость, экспериментальная
анатомия.

Надійшла: 23.11.2010

Прийнята: 21.12.2010

УДК: 612.419+612.83:611-08

УЛЬТРАМИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ПОД ДЕЙСТВИЕМ КСЕНОГЕННОЙ СПИНОМОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ

Резюме. Благодаря исследованиям ученых ксеногенная спинномозговая жидкость рассматривается как возможный субстрат для производства мощного адаптогена биологического происхождения. Одним из показательных исследований является изучение морфофункциональных изменений костного мозга, как центрального органа гемопоэза и иммуногенеза. В статье приведены ультрамикроскопические изменения клеток костного мозга под действием ксеногенной спинномозговой жидкости в различных возрастных группах крыс линии Вистар. Показано усиление синтетических процессов в клетках костного мозга первых трех возрастных групп и истощение механизмов активации в четвертой возрастной группе, что выражалось в набухании и деструкции митохондрий, вакуолизации цитоплазмы, инвагинации кардиолеммы.

Морфологія. – 2010. – Т. IV, № 4. – С. 67-72.

© Л.Р.Шаймарданова, 2010

Shaymardanova L.R. Ultrastructural changes of bone marrow cells exposed for xenogenous cerebrospinal fluid.

Summary. Due to the scientific investigations xenogenous cerebrospinal fluid was considered as possible substance for the production of powerful adaptogen of biological origin. One of the representative research in these field demonstrates morphological and functional changes of bone marrow as the central hemopoetic and immune organ. The article shows the ultramicroscopic changes of bone marrow cells after the xenogenous cerebrospinal fluid exposure in Vistar rats of different age. It was revealed the activation of synthetic processes in bone marrow cells of the first three age groups and exhaustion of activating mechanisms in the fourth age group, that was manifested in swelling and destruction of mitochondria, vacuolisation of cytoplasm, invagination of caryolemma.

Key words: bone marrow, cerebrospinal fluid, experimental anatomy.

Введение

Уникальная жидкостная среда организма, спинномозговая жидкость (СМЖ), являющая собой единую ось нейрогуморальной и эндокринной регуляции организма, исследуется учеными на протяжении столетия. Параллельно с изучением ее состава велись наблюдения по возможности применения СМЖ для коррекции патологических состояний (Фридман А.П., 1971; Макаров А.Ю., 1978). Первоначально изучались биологические свойства аллогенной СМЖ, инфузии которой доказывали ее высокую эффективность как терапевтического средства; в дальнейшем, стали применять и ксеногенный ликвор (КСМЖ) (Ажипа Я., Топало В., 1986; Цветанова Е.М., 1986), преимущественно от крупного рогатого скота, как наиболее близкий по составу к СМЖ человека (Ткач В.В. и соавт., 2004). В экспериментах было доказано отсутствие тератогенных, эмбриотоксических свойств КСМЖ, а также иммунопатологических реакций после введения КСМЖ (Ткач В.В., 1998; Ткач В.В.(мл.) и соавт., 2006а, б). Доклинические исследования

по изучению свойств КСМЖ, которая рассматривается как возможное сырье для производства нового иммунобиологического препарата, проводятся *in vivo* в Крымском государственном медицинском университете им. С.И.Георгиевского на базе кафедры нормальной анатомии человека (Пикалюк В.С. и соавт., 2010). Одним из показательных исследований является изучение морфофункциональных изменений костного мозга, как центрального органа гемопоэза и иммуногенеза под действием КСМЖ. В частности, исследовали ультрамикроскопические изменения клеток различных дифферонов костного мозга под действием КСМЖ.

Целью настоящего исследования явилось изучение ультраструктурных изменений клеток костного мозга под действием ксеногенной спинномозговой жидкости в различных возрастных группах крыс.

Материал и методы

Спинномозговую жидкость получали субокципитальной пункцией от лактирующих коров в стерильную полужакрытую систему по методу

В.В.Ткача (2004), проводили через бактериальные фильтры «Миллипор» и запаивали в ампулы. Для эксперимента были отобраны белые крысы линии Вистар обоих полов 4 возрастных категорий: новорожденные, неполовозрелые (инфантильные), половозрелые (молодой репродуктивный возраст) и животные предстарческого возраста, обозначенные римскими цифрами I, II, III, IV соответственно. КСМЖ вводили однократно, трехкратно и десятикратно с интервалом в два дня. Материал для исследования – костный мозг забирали на седьмые и тридцатые сутки. В каждой серии эксперимента изменения показателей экспериментальных животных сравнивали с показателями контрольных животных того же пола, возраста, массы. Для анализа субклеточных изменений с помощью электронной микроскопии из бедренной кости извлекали кусочек костного мозга размером 1 мм³, фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида на фосфатном буфере с pH 7,2-7,4 в течение 1 часа при температуре -4°C. Материал промывали в 0,1 М фосфатном буфере 3 раза по 20 минут и дофиксировали 1% раствором тетраоксида осмия на 0,1% фосфатном буфере 2,5 часа. После проведения через батарею спиртов возрастающей концентрации и абсолютном ацетоне, материал заливали в капсулы смесью эпоксидных смол. Полимеризацию осуществляли в термостате при температуре 37°C (12 часов), 56°C (12 часов), 45°C (12 часов). Полутонкие срезы толщиной 0,5-1,5 мкм изготавливали на ультратоме ЛКБ-460, с последующим контрастированием метиленовым синим. После изучения полутонких срезов, готовили ультратонкие срезы с помощью ультрамикротом ULTRACUT с окраской уранилацетатом и цитратом свинца. Просмотр и фотографирование срезов производили на электронном микроскопе РЕМ-106.

Результаты и их обсуждение

У животных I группы при однократном введении КСМЖ на 7 сутки отмечались следующие изменения костного мозга. Клетки эритроидного ряда не показывали сколько-нибудь значимых изменений, как в структурной организации ядра, так и структурной организации цитоплазмы. Нередко встречались фигуры митоза. В эозинофильных миелоцитах ядра имели бухтообразные выпячивания, четко определяются активные ядрышки (рис. 1). В цитоплазме наряду с первичными гранулами округлой формы определяли единичные специфические гранулы с плотным кристаллоидом. Выделялись резко расширенные цистерны гранулярной эндоплазматической сети с мелкозернистым содержимым. В цитоплазме макрофага было заметно большое количество лизосом. Ядра клеток лимфоидного ряда округлой или овальной формы с преобладанием эухроматина; гетерохроматин располагался преимущественно у кариолеммы, определялись яд-

рышки. В цитоплазме также отмечали большое количество полирибосом, плазмолемма характеризовалась наличием немногочисленных микроворсинок. Мегакариоциты имели сильно дольчатое полиплоидное ядро с резкими углублениями кариолеммы, окруженной узким ободком цитоплазмы, в которой определялись единичные гранулы. На плазмолемме – многочисленные короткие отростки. На 30 сутки у животных I группы отмечалось выраженное увеличение количества дифференцирующихся клеток миелоидного ряда. Ядра нейтрофильных гранулоцитов преимущественно состояли из нескольких сегментов, цитоплазма умеренной электронной плотности, органеллы общего назначения развиты слабо: немногочисленные митохондрии округлой формы с просветленным матриксом и деструкцией крист, единичные цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума. Специфические гранулы количественно преобладали над неспецифическими гранулами, а также имели меньшую электронную плотность по сравнению с первичными (неспецифическими) гранулами. В округлом ядре базофильного эритробласта преобладал эухроматин. В цитоплазме заметны многочисленные полисомы и единичные митохондрии округлой или овальной формы. В полихроматофильном эритробласте ядро округлой формы, хроматин в виде крупных сгруппированных гранул, преобладал гетерохроматин. В отдельных участках красного костного мозга встречались единичные адипоциты.

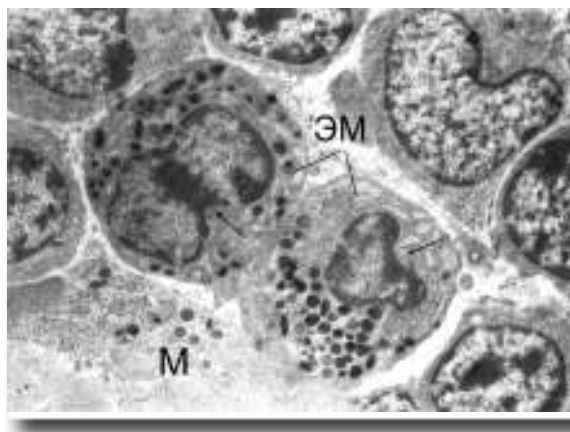


Рис. 1. М – фрагмент макрофага, ЭМ – эозинофильный миелоцит. Стрелками показаны инвагинации кариолеммы. Костный мозг. I группа на 7 сутки эксперимента. $\times 3200$.

У животных II группы на 7 сутки после трехкратного введения КСМЖ отмечены незначительные изменения в фибробластах. Кариолемма зрелого фибробласта имела фестончатый вид с большим количеством ядерных пор. В ядре преобладал эухроматин. В цитоплазме хорошо развита гранулярная эндоплазматическая сеть, которая на отдельных участках прилежала к

плазмолемме. В различных участках цитоплазмы встречалось умеренное количество лизосом, а также комплекс Гольджи, в виде отдельных пузырьков и цистерн. Митохондрии крупные, округлой формы, однако кристы частично разрушены.

В межклеточном веществе хорошо видны тонкие коллагеновые фибриллы. Данные изменения свидетельствовали об активации синтетической активности. В ядре базофильного гранулоцита преобладал гетерохроматин. В цитоплазме специфическая зернистость представлена различными по размеру и форме гранулами, многие из них имеют светлый ободок. Микроворсинки на поверхности базофилов отсутствовали. В центре нормобласта располагались маленькие сферические темноокрашенные пикнотические ядра. В той же группе на 30 сутки после десятикратного введения КСМЖ отмечались изменения в клетках эритроидного ростка (рис. 2). Базофильные эритробласты характеризовались наличием крупного эухромного ядра с одним ядрышком. Цитоплазма имела умеренную электронную плотность, что связано с умеренным развитием гранулярной эндоплазматической сети (ЭПС), многочисленные полирибосомы, что свидетельствовало в пользу протекания в клетке активных синтетических процессов (синтез гемоглобина); немногочисленные митохондрии были округлой формы, кристы разрушены, сохранена лишь наружная мембрана.

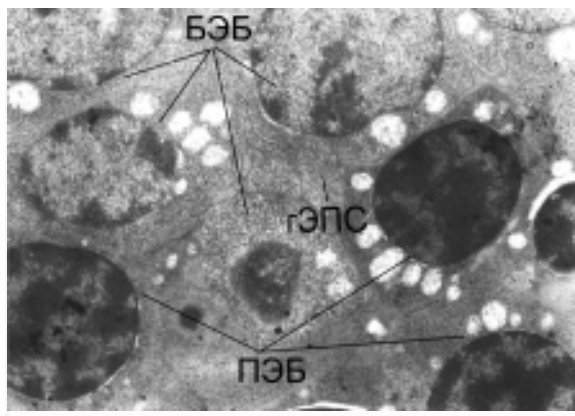


Рис.2. Группа эритроидных клеток – базофильные эритробласты (БЭБ) с развитой гранулярной эндоплазматической сетью (гЭПС), выражена деструкция митохондрий. Полихроматофильные эритробласты (ПЭБ). КМ. II группа животных, 30 сутки эксперимента, после 10-кратного введения КСМЖ. $\times 4800$.

У полихроматофильных эритробластов ядро более электронно-плотное, ядрышки не определялись, а хроматин выявлялся в виде крупных агрегированных гранул. Изменения в цитоплазме были аналогичны изменениям в базофильных эритробластах. Отмечались нейтрофильные гранулоциты на разных стадиях развития. Независимо от степени дифференцировки в клетках

отмечались дистрофические изменения. Темное гетерохромное ядро (в некоторых случаях пикнотично измененное), расширение перинуклеарного пространства, цитоплазма обеднена органеллами, митохондрии крупные, с просветленным матриксом, частичным или полным разрушением мембран органеллы. ЭПС редуцирована, в цитоплазме встречались рибосомы и полисомы. Обращало внимание небольшое количество гранул по сравнению с контролем. В эозинофильных метамиелоцитах структурная организация гранул существенно не изменялась (изменения касались лишь их количества). В цитоплазме определялись неспецифические (первичные гранулы), а также специфические гранулы овальной формы с кристаллоидом внутри, расширенные цистерны гранулярной ЭПС с мелкозернистым содержимым, а также единичные митохондрии округлой формы с деструкцией крист. Расширение цистерн ЭПС указывало на активный синтетический процесс в эозинофильном метамиелоците, несмотря на значительные дистрофические повреждения. Ядро активированного лимфоцита небольшое, округлой формы, преобладал гетерохроматин, расположенный по периферии ядра. Цитоплазма просветлена, в ней определялись вакуоли, большое количество рибосом и полисом. В гемопоэтических клетках гранулоцитарного ряда выражены дистрофические изменения: цитоплазма просветлена, митохондрии набухшие, вакуолизированы. Матрикс их просветлен, а кристы разрушены. Расширенные цистерны гранулярной ЭПС сливались и образовывали вакуоли с электронно-прозрачным содержимым. В цитоплазме макрофага определялись расширенные цистерны гранулярной ЭПС, сферические митохондрии с разрушенными кристами и сохраненной внешней мембраной, умеренное количество рибосом. Обращали на себя внимание большое количество лизосом и фаголизосом различных размеров и электронной плотности. Дифференцирующиеся клетки миелоидного ряда тесно контактировали с ретикулярной клеткой, среди них определялся проплазмцит. Его ядро округлой формы с крупным активным ядрышком в клетке расположено эксцентрично. Вокруг ядра расположенные цистерны гранулярной ЭПС, большая их часть расширена и заполнена мелкозернистым содержимым. В цитоплазме определялись единичные митохондрии округлой формы и мелкие гранулы средней электронной плотности.

У животных III группы как после трехкратного так и после десятикратного введения КСМЖ отмечали идентичные изменения. В цитоплазме активного плазмоцита хорошо развит эндоплазматический ретикулум, расширенные цистерны которого имели неровные контуры и заполнены мелкозернистым содержимым. Митохондрии гипертрофированы, несмотря на набу-

хание и частичную деструкцию крист митохондрии находятся в активном состоянии. Развивающиеся миелоидные клетки, за исключением лимфоцитов, или дифференцирующиеся клетки гранулоцитарного ряда, обычного строения (рис. 3). Существенных изменений не отмечали, цитоплазма клеток содержала умеренное количество органелл (характерное для каждого отдельного типа клеток), митохондрии небольших размеров с электронно-плотным матриксом.

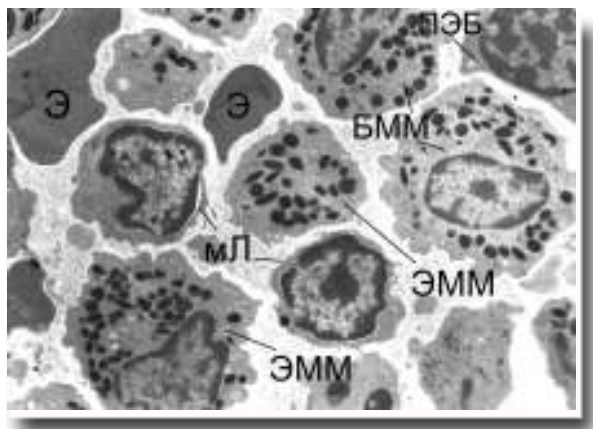


Рис.3. Группа клеток нормальной морфологии. Базофильный метамиелоцит (БММ), эозинофильный метамиелоцит (ЭММ), полихроматофильный эритроblast (ПЭБ), эритроциты (Э), малые лимфоциты (МЛ). КМ животных III группы на 30 сутки. . ×3200

У животных IV группы на 7 сутки после трехкратного введения КСМЖ в эозинофильных миелоцитах отмечали крупное ядро с бухтообразным выпячиванием и небольшим ядрышком. В цитоплазме имелись первичные и вторичные гранулы, четко визуализировались расширенные цистерны гранулированной ЭПС, большое количество полисом, небольшое количество крупных полуразрушенных митохондрий. В ядре пролимфоцитов преобладал равномерно расположенный эухроматин, небольшое количество структурного хроматина располагалось под кариолеммой, в кариоплазме встречались небольших размеров ядрышки (чаще всего одно). В цитоплазме много полисом с хорошо развитой гранулярной ЭПС, единичные митохондрии округлой формы с частичной деструкцией крист. Ядерный хроматин эритробластов образовывал глыбки, а цитоплазма содержала большое количество свободных рибосом, встречались единичные округлые митохондрии с деструкцией крист и цистерны гранулярной ЭПС. Между клетками эритроидного ряда отмечались клетки в период митоза с конденсированными хромосомами и полным отсутствием специфических органелл и включений.

В макрофагах умеренные признаки деструкции митохондрий, в виде просветления матрикса и деструкции их крист. Гранулярная ЭПС была представлена небольшими расширенными цис-

тернами. Во всех клетках большое количество свободных рибосом и полисом. Средние и малые лимфоциты без выраженных нарушений, наиболее существенные изменения отмечали в митохондриях, которые характеризовались частичной деструкцией крист и просветленным, вакуолизированным матриксом. У предстарческих животных после десятикратного введения КСМЖ в цитоплазме промиелоцита определялся хорошо развитый белок-синтетический аппарат клетки: гранулярная ЭПС, комплекс Гольджи и многочисленные полирибосомы. Митохондрии округлой формы с просветленным матриксом, в некоторых митохондриях визуализировались отдельные кристы. Большое крупное округлой формы ядро имело неглубокие инвагинации. Кариоплазма заполнена нежным диффузно-гранулярным хроматином и содержала ядрышко. Со стороны инвагинации ядра имелось небольшое количество первичных гранул различной электронной плотности. Ядро активного фибробласта характеризовалось наличием неровного изрезанного контура, гетерохроматин располагался по периферии ядра в виде пояса. Цистерны гранулярной ЭПС имели параллельный ход, были незначительно расширены, что свидетельствовало в пользу функциональной активности. Митохондрии немногочисленные, округлой формы. В межклеточном веществе в месте локализации фибробласта определялись тонковолокнистые структуры. В дифференцирующихся клетках миелоидного ряда наблюдалась частичная деструкция крист митохондрий в палочкоядерном и юном нейтрофильных гранулоцитах, отмечалось обеднение цитоплазмы гранулами (рис. 4).

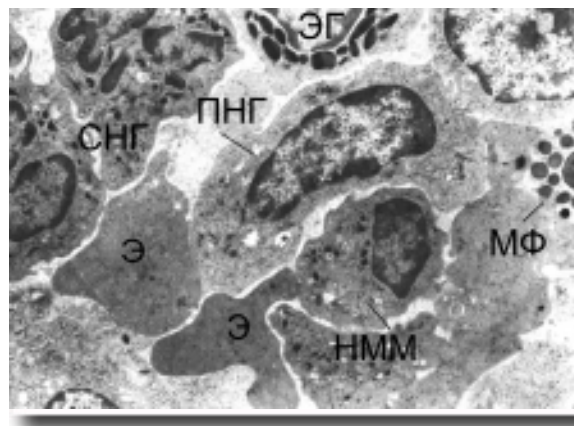


Рис. 4. Сегментоядерный нейтрофильный гранулоцит (СНГ), палочкоядерный нейтрофильный гранулоцит (ПНГ), эритроциты (Э), нейтрофильный метамиелоцит (НММ), фрагмент дифференцирующегося эозинофильного гранулоцита (ЭГ), фрагмент цитоплазмы макрофага (МФ), фрагмент бластной клетки (Б). КМ животных IV группы на 30 сутки эксперимента. Ув. . ×4000.

В бластных клетках выявлялись крупные ядра с преобладанием эухроматина. В цитоплаз-

ме – большое количество полисом, хорошо развита гранулярная ЭПС. Наряду с крупными митохондриями округлой формы с просветленным матриксом и частичной деструкцией крист отмечались овальные митохондрии с плотным матриксом. В эритропоэтическом островке наблюдались митотически делящиеся клетки. В мегакариоцитах определялись крупное дольчатое ядро, кариолема с неровными контурами, многочисленными инвагинациями и большим количеством ядерных пор. Цитоплазма заполнена большим количеством гранул и канальцев. Периферическая часть клетки разделена анастомозирующими пластинчатыми демаркационными каналами на множество фрагментов.

Таким образом, можно отметить усиление синтетических процессов в клетках костного мозга первых трех групп, особенно после трехкратного введения КСМЖ. После десятикратного введения КСМЖ на 30 сутки отмечали истощение механизмов активации клеток всех дифферонов, что выражалось в набухании и деструкции митохондрий, вакуолизации цитоплазмы, инвагинации кариолеммы. Особенно интенсивно

данные нарушения проявлялись в IV группе животных как при трехкратном, так и при десятикратном введении КСМЖ.

Заключение

Результаты, полученные при ультрамикроскопическом исследовании клеток костного мозга, подвергнутого воздействию КСМЖ, трудно трактовать однозначно, без сопоставления с данными гистоморфологического анализа. Субклеточные изменения, обнаруженные в четвертой возрастной группе, независимо от кратности КСМЖ, не обязательно являются признаком скорой гибели клеток, а могут быть началом жирового перерождения красного костного мозга в желтый, что с одной стороны, уменьшит объем гемопоэтической ткани в пределах костномозговой полости, но, с другой стороны, обеспечит энергетический запас для роста и развития кости (Gevers E.F., 2002).

Перспективы дальнейших разработок связаны с изучением ультраструктурных изменений клеток костного мозга под действием различных ксеногенных агентов в зависимости от возраста.

Литературные источники

Ажипа Я. И. Влияние цереброспинальной жидкости различного видового происхождения на трофическое и функциональное состояние органов и тканей и функциональное состояние и физиологическая активность цереброспинальной жидкости при нарушении трофической функции нервной системы / Я. И. Ажипа, В. Топало // Физиология человека. — 1986. — Т. 12, № 4. — С. 531–552.

Макаров А. Ю. Роль ликвора в нейрогуморальной регуляции физиологических функций // Успехи физиологических наук. — 1978. — Т. 9, № 4. — С. 82–96.

Пат. 62850А Україна, МПК⁷ А 61 К 35/24, А 61 К 35/12. Спосіб одержання цільного лікворного препарату / В. В. Ткач, Ф. В. Адамень, В. В. Лисенко [и др.]; заявник та патентовласник Закрите акціонерне товариство "Інститут "Кримагропроект". - № 2003087810 ; заявл. 18.08.03 ; опубл. 15.12.2003, Бюл. № 12. — 3 с.

Пикалюк В. С. Ликвор как гуморальная среда организма / В. С. Пикалюк, Е. Ю. Бессалова, В. В. Ткач [и др.]; заявник та патентовласник Закрите акціонерне товариство "Інститут "Кримагропроект" // ИТ «Ариал». — Симферополь, 2010. — 192 с.

Ткач В. В. Нормальный химический состав и содержание некоторых биологически активных веществ в цереброспинальной жидкости крупного рогатого скота / В. В. Ткач, В. В. Ткач (мл.), В.

В. Киселев // Клінічна анатомія та оперативна хірургія. — 2004. — № 3. — С. 61.

Ткач В. В. Определение тератогенных и эмбриотоксических свойств биопрепарата "Ликворин" / В. В. Ткач, А. В. Кубышкин, В. В. Ткач (мл.) // Проблемы, достижения и перспективы развития медико-биологических наук и практического здравоохранения: [сб. тр. Крым. мед. унта]. — Симферополь, 1998. — Т. 134. — С. 89–95.

Ткач В. В.(мл.) Влияние ксеногенной спинномозговой жидкости на клеточный иммунитет в эксперименте / В. В. Ткач (мл.), В. В. Ткач, М. А. Кривенцов // Клінічна анатомія та оперативна хірургія. — 2006. — Т. 5, № 2. — С. 61–62

Ткач В.В.(мл.). Влияние ксеногенной спинномозговой жидкости на реакции гуморального иммунитета / В. В. Ткач (мл.), В. В. Ткач, М. А. Кривенцов // Клінічна анатомія та оперативна хірургія. — 2006. — Т. 5, № 2. — С. 62.

Фридман А. П. Основы ликворологии / А. П. Фридман. - Л. : Медицина, 1971. — 647 с.

Цветанова Е. М. Ликворология: [пер. с болг.] / Е. М. Цветанова. — К. : Здоров'я, 1986. — 372 с.

Gevers E. F. Bone marrow adipocytes: a neglected target tissue for growth hormone / Evelien F. Gevers, Nigel Loveridge, Iain C. A. F. Robinson // Endocrinology. — 2002. — Vol. 143, № 10. — P. 4065–4073.

Шаймарданова Л.Р. Ультрамiкроскопiчнi змiни клiтин кiсткового мозку пiд впливом ксеногенної спинномозкової рiдини.

Резюме. Завдяки дослідженням учених ксеногенна спинномозкова рідина розглядається як можливий субстрат для виробництва потужного адаптогена біологічного походження. Одним з показових досліджень є вивчення морфофункціональних змін кісткового мозку, як центрального органу гемопоеза та імуногенеза. У статті приведені ультрамiкроскопiчнi змiни клiтин кiсткового мозку пiд впливом ксеногенної спинномозкової рiдини у рiзних вiкових групах щурiв лiнii Вiстар. Показано посилення синтетичних процесiв в клiтинах кiсткового мозку перших трьох вiкових груп i виснаження механiзмiв активацii в четвертiй вiковiй групi, що проявлялося в набуханнi та деструкцii мiтохондрiй, вакуолiзацii цитоплазми, iнвагiнацii карiолеми.

Ключові слова: кiстковий мозок, спинномозкова рiдина, експериментальна анатомiя.