

УДК 611.013.35:616-001.28

Р.В. Салютін, С.С. Паляниця

## ХАРАКТЕРИСТИКА ЕМБРІОНАЛЬНОГО КРОВОТВОРЕННЯ У КРОЛІВ

Координаційний центр трансплантації органів, тканин і клітин МОЗ України, м. Київ

**Резюме.** Проведено дослідження з метою визначення характеру перебігу ембріонального кровотворення у кролів на різних стадіях гестації. Доведено, що в першому та другому триместрі вагітності в ембріональній печінці та жовчному міхурі спостерігається посилений гемопоєз із переважним еритропоєзом.

Значна кількість недиференційованих та лімфоцитоподібних клітин, які розглядаються як пул стовбурових

та комітованих клітин-попередників всіх паростків кровотворення зумовлює доцільність отримання активного клітинного трансплантата саме в першому та другому триместрі.

**Ключові слова:** ембріональна печінка, кровотворення, гестація, гемопоєз, еритропоєз.

**Вступ.** В останні роки спостерігається бурхливий розвиток медичних та наукових технологій, які стосуються дослідження стовбурових клітин.

Особливу цікавість у дослідників викликають стовбурові клітини ембріофетального походження, а саме їх здатність до відновлення (заміщення) пошкоджених або втрачених клітин реципієнтного організму [1-3, 7].

Зазначимо, що будь-яке клінічне дослідження з використанням стовбурових клітин повинно пройти певні передклінічні етапи, одним з яких є моделювання за умов *in vivo* тієї або іншої патології, що зумовлює в тому числі і пошук раціонального джерела клітинного матеріалу.

Основним джерелом в ембріофетальному періоді плюрипотентних клітин є печінка та жовчний міхур, які містять значну кількість гемопоєтичних і прогеніторних клітин та клітин – попередників [4].

Аналіз наукової літератури стосовно пошуку доступного та джерела клітинного матеріалу, придатного для проведення експериментальних досліджень, свідчив, що найбільш вивченим та дослідженим джерелом стовбурових клітин є печінка мишей [5].

Однак для моделювання цілої низки патологічних станів миші є невідповідним тваринним матеріалом, що потребує пошуку інших придатних для експериментальної роботи тварин, у тому числі і кролів.

У той же час наукові роботи щодо деталізації процесу кровотворення та формування пулу стовбурових клітин фетальної печінки кролів практично відсутні.

**Мета дослідження.** Дослідити склад клітинної популяції фетальної печінки і жовчного міхура та визначити оптимальний строк гестації, при якому можливо отримати активний клітинний пул.

**Матеріал і методи.** Ембріони для дослідження отримували від заздалегідь здорових тварин (кролі породи «Сірий велетень» на різних строках гестації (10, 20, 30 днів вагітності). Ембріони діставали з плідних оболонок, черевну стінку обробляли дезінфікуючим розчином, розсікали гострокінцевими ножицями і виймали печінку.

Печінку тричі промивали стерильним розчином Хенкса з антибіотиком (канаміцин або гентаміцин у кінцевій концентрації 50 од/мл), подрібнювали на фрагменти і поступово поміщали в гомогенізатор Поттера, де їх обережно роздавлювали поступовими рухами пестика для отримання гомогенної суспензії, додаючи 1-2 % розчину Хенкса.

Клітини змивали зі стінок і пестика невеликою кількістю розчину Хенкса і пропускали крізь фільтр системи для переливання крові чи кровозамінників та інфузійних розчинів (ПК-11-01, ПК-11-05) з наступним пасажем через ін'єкційні голки меншого діаметра (0,6-0,8 мм). Кількість клітин в суспензії підраховували в камері Горяєва.

Для визначення морфологічного складу клітин робили мазки суспензії і відбитки печінки, фіксували розчином Май-Грюнвальд і забарвлювали за методом Романовського.

Для ідентифікації клітин мієлоїдного й еритроїдного рядів використовували цитохімічні реакції: колір на пероксидазу [6], катіонні білки [8], фетальний і внутрішньоклітинний гемоглобін [9].

Мікроскопічний аналіз препаратів проводили на мікроскопі Біолар при збільшенні  $\times 1200$  під імерсією.

Статистичну обробку результатів проводили за методом Стьюдента-Фішера програмним комплексом STAT.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Проведені макроскопічні дослідження показали, що на 10-й день вагітності зародок сформований, жовчний міхур добре вирізняється, на ньому помітні кровоносні судини. Це період його найвищого розвитку, коли він є органом, який постачає зародку поживні речовини.

При мікроскопічному дослідженні клітинного складу жовчного міхура (10 днів гестації) виявлено високий вміст недиференційованих бластних ( $8,43 \pm 1,69$  %) і лімфоцитоподібних ( $5,57 \pm 1,74$  %) клітин.

Недиференційовані бластні клітини досить великі за розміром із достатньо високим ядерно-цитоплазматичним співвідношенням.

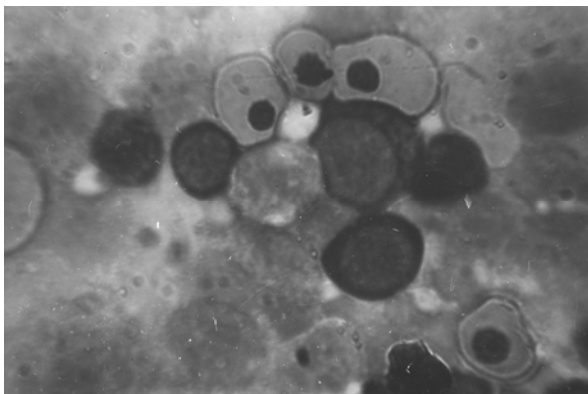


Рис. 1. Недиференційована бластна клітина. Забарвлення азур-еозином. x 1200

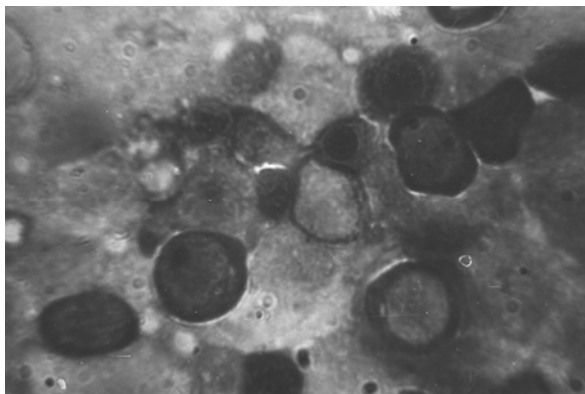


Рис. 2. Лімфоцитоподібна проеритробластна клітина. Забарвлення азур-еозином. x 1200

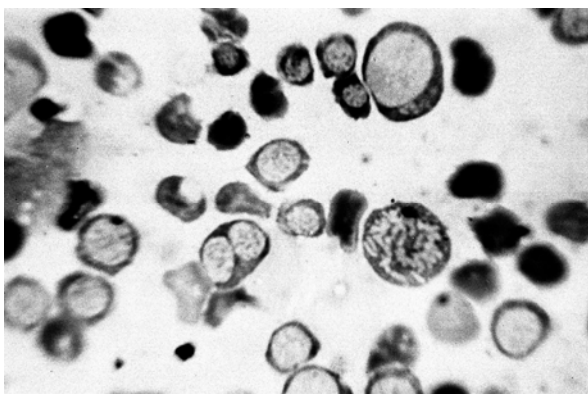


Рис. 3. Примітивні проеритробласти. Забарвлення за методом Клейнгауера та Бетке. x 1200

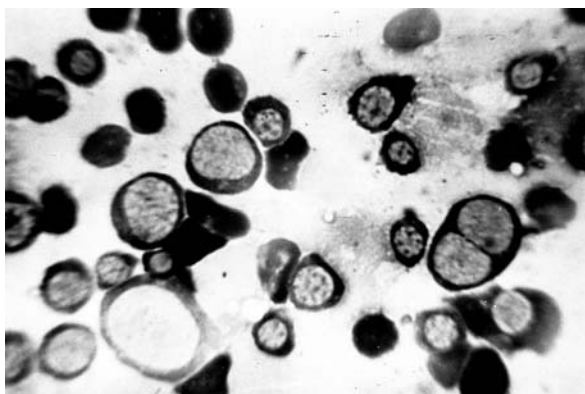


Рис. 4. Дефінітивний еритропоз. Еритроblastи I, II і III типів та еритроцити. Забарвлення азур-еозином. x 1200

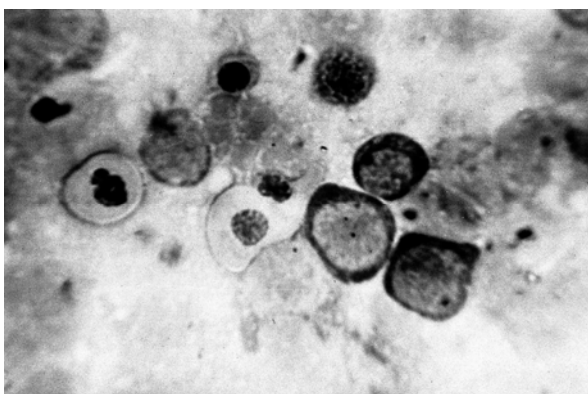


Рис. 5. Острівець Бессіса, у центрі макрофаг, оточений еритроblastами. Забарвлення азур-еозином. x 1200

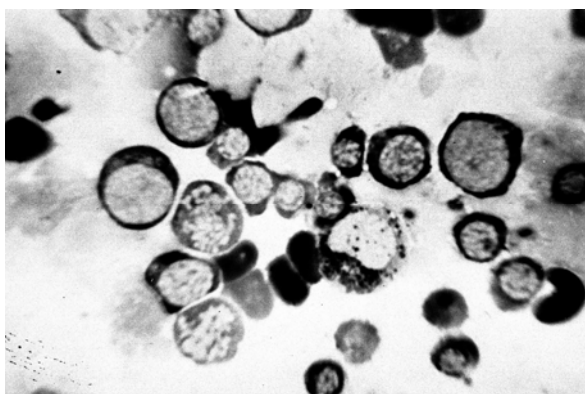


Рис. 6. Мієлобласт оточений дефінітивними еритроblastами. Забарвлення азур-еозином. x 1200

Цитоплазма вузька, базофільна, без помітних включень. Ядро з 3-4 ядерцями. Ядерний хроматин має сітчасту структуру (рис. 1).

Лімфоцитоподібні клітини діаметром від 25 мкм зі слабо базофільною цитоплазмою. Ядра округлої форми, розташовуються переважно ексцентрично. Ядерця не виразні.

Ці клітини можуть бути попередниками стовбурових клітин (рис. 2).

Основною ознакою гемопоезу раннього ембріонального періоду є переважне диференціювання стовбурових клітин по еритроїдному ряду.

У жовчному міхурі виявляються характерні для цього віку примітивні проеритробласти мегалобластичного типу: I тип –  $11,14 \pm 3,18$  %; II тип –

$11,0 \pm 1,58$  %; III тип –  $29,57 \pm 4,13$  %, еритроцитів мало –  $5,43 \pm 1,89$  %.

Примітивні проеритробласти ( $22,57 \pm 3,57$  %) мали поліхроматофільну цитоплазму, велике світле ядро з 1-3 ядерцями, примітивні еритроblastи були дещо меншого розміру зі слабо оксифільною цитоплазмою, молодим ядром, що містило щільний хроматин.

Характерною ознакою про еритроblastів є їх здатність до синтезування гемоглобіну “ембріонального” типу (рис. 3).

У відбитках жовчного міхура ембріонів у значно меншій кількості, ніж попередні клітини, визначаються моноцити ( $4,57 \pm 1,19$  %) і макрофаги ( $1,57 \pm 0,84$  %).

Останні представлені клітинами великого розміру та неправильної форми, мали світло-блакитну цитоплазму, що містила вакуолі і фагоцитозний матеріал.

Клітинне ядро молоде та характеризувалось сітчастим малюнком хроматину. Елементів гранулоцитарного ряду в цей строк дослідження не виявлено, що пов'язано зі специфічним впливом строми жовчного міхура на напрямок диференціювання гемопоетичних клітин-попередників.

У печінці ембріону кроля II періоду гестації (20 днів) кількість недиференційованих бластних і лімфоцитоподібних клітин знижується в три та п'ять разів ( $2,57 \pm 0,71$  % і  $1,0 \pm 1,85$  % відповідно) порівняно з попереднім дослідженням відбитка жовчного міхура ( $p < 0,05$ ).

Еритроїдні елементи становлять основну масу клітин: проеритробласти -  $10,28 \pm 1,45$  %; еритробласти I типу -  $12,0 \pm 2,54$  %; II типу -  $27,15 \pm 3,4$  %; III типу -  $15,0 \pm 4,02$  %; еритроцитів -  $26,0 \pm 5,43$  %.

З'являються клітини дефінітивного еритропоезу (рис. 4), з морфологічними ознаками нормобластів. За величиною вони менші мегалобластів і досягають 8-12 мкм відповідно ступеня їх зрілості.

Базофільні нормобласти починають синтезувати фетальний гемоглобін. У міру того як насичення гемоглобіном розповсюджується на всю цитоплазму, вона стає поліхроматофільною, а потім - оксифільною. Разом із гемоглобінізацією цитоплазми виникає одночасне ущільнення хроматинової сітки ядра.

Зникають ядерця, ядерна речовина приймає радикальну вичерченість, характерну для нормобласта.

Нормобласт перетворюється в еритроцит шляхом звільнення клітини від пікнотичного ядра. У цей період розвитку кількість еритроцитів значно збільшується.

У відбитках ембріональної печінки кролів II періоду гестації бачимо "острівці Бессіса". У центрі острівця визначали макрофаг, що містив у цитоплазмі пікнотичні чи дегенеративно змінені ядра еритробластів.

Оточуючі еритробласти ортохроматофільні чи поліхроматофільні, але не базофільні (рис. 5).

Поряд із дефінітивними, деякий час ще продовжує здійснюватись і примітивний еритропоез. Елементи даних рядів відрізняються один від одного не тільки морфологічно, але й типом синтезуючого гемоглобіну.

В ембріональній печінці кроля 20-денного розвитку відсутні зрілі форми гранулоцитопоезу, гранулоцитарний паросток представлений мієлобластами ( $0,43 \pm 0,39$  %) і мієлоцитами ( $0,14 \pm 0,27$  %).

Мієлобласт має велике ядро, що оточене вузьким обідком базофільної цитоплазми, у ньому 2-5 ядерця. Характерною ознакою є зернистість у цитоплазмі мієлобласта (рис. 6).

У мієлоцитах завершується дозрівання специфічної зернистості. Мієлоцит досягає 13-15 мкм і

більше. Ядро округлої форми, цитоплазма фіолетово-рожевого кольору.

Кількість моноцитів і макрофагів майже не змінюється порівняно із жовчним міхуром, їх стає  $3,14 \pm 0,99$  % і  $1,29 \pm 0,69$  % відповідно. Генетична близькість цих елементів підтверджується також ідентичністю цитохімічних ознак.

На 30-у добу дослідження в ембріональній печінці виявляються переважно еритроцити, кількість яких поступово збільшується та становить  $42,14 \pm 3,48$  %.

Окрім того, збільшується відсоток моноцитів та макрофагів ( $p < 0,05$ ), клітини мієлоїдного паростка в популяції одиничні. Зазначені зміни свідчать про диференціацію клітинного складу ембріональної печінки та наявність еритропоезу дефінітивного типу.

Таким чином, проведені дослідження дозволили встановити, що в ембріональній печінці кролів у першому і другому триместрі вагітності спостерігається посилений гемопоєз з перевагою еритропоезу.

Клітини дефінітивного еритропоезу поступово змінюють примітивні до кінця другого періоду вагітності.

Наявність великої кількості недиференційованих і лімфоцитоподібних клітин, які можна розглядати як пул стовбурових та комітованих клітин-попередників всіх паростків кровотворення, робить дану популяцію клітин придатною для моделювання різноманітних порушень гемопоєзу в кролів.

## Висновки

1. Встановлено, що в першому періоді гестації активне кровотворення проходить у жовчному міхурі та на початку другого розпочинається в печінці.

2. Характерною ознакою клітинного пулу першого та другого періоду гестації є наявність недиференційованих бластних і лімфоцитоподібних клітин, а також клітин мегалобластичного типу на різних стадіях диференціювання та синтезу «ембріонального» гемоглобіну.

3. Клітинний пул третього періоду гестації характеризувався збільшенням кількості без'ядерних еритроцитів, моноцитів, макрофагів та переважним еритропоезом дефінітивного типу.

4. Враховуючи характерні особливості клітинного пулу ембріональної печінки на різних стадіях розвитку, найбільш сприятливим періодом для отримання активного клітинного трансплантата є 10-20-а доба гестації.

5. Характерні особливості клітин ембріональної печінки кролів дозволяють використовувати дані тварин для експериментального моделювання з вивченням механізму дії клітинного трансплантата на організм реципієнта.

## Література

1. Кухарчук О.Л. Ствобурові клітини фетальної печінки: проблеми ідентифікації та проблеми застосування у практичній медицині /

- О.Л. Кухарчук, Т.М. Ганжа // Трансплантологія. – 2007. – Т. 9, № 1. – С. 147-150.
2. Салютін Р.В. Імуногістохімічна характеристика ангіогенезу після трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин фетальної печінки людини в умовах експериментальної ішемії / Р.В. Салютін // Трансплантологія. – 2009/2010. – С. 67-74
  3. Смикодуб О.І. Лікування хворих на цукровий діабет 2-го типу в дебюті захворювання ембріональними стовбуровими клітинами / О.І. Смикодуб, А.В. Новицька // Трансплантологія. – 2007. – Т. 9, № 1. – С. 278-282.
  4. Кухарчук А.Л. Стволові клітини : експеримент, теорія, клініка / Кухарчук А.Л., Радченко В.В., Сирман В.М. – Черновці: Золоті літаври, 2004. – 505 с.
  5. Dzierzak E. Mouse embryonic haemopoiesis / E. Dzierzak, A. Medinsky // Trends Genetic. – 1995. – Vol. 9. – P. 228-236.
  6. Langerova A.L. Quantitative study on interactions of cellular grafts in mouse radiation chimeras / A.L. Langerova // Folia Biol. – Praha. – 1963. – Vol. 9. – P. 196-201.
  7. Cryopreserved fetal liver cell transplantation in rat with CCl4-induced cirrhosis / O. Ochenasko, N. Volkova, S. Mazur [et al.] // Cell transplantation. – 2006. – Vol. 15, № 1. – P. 23-33.
  8. Santos G.W. Immunosuppression for clinical marrow transplantation / G.W. Santos // Lomin. Hematol. – 1974. – Vol. 11. – P. 341-391.
  9. Long survival and immunologic reconstitution following transplantation with syngeneic or allogeneic fetal liver neonatal spleen cells / E.I. Yunis, G. Fernandes, J. Smith [et al.] // Transplant. Proc. – 1976. – Vol. 8, № 4. – P. 521-525.

## ХАРАКТЕРИСТИКА ЕМБРИОНАЛЬНОГО КРОВЕТВОРЕННЯ КРОЛИКОВ

*Р.В. Салютин, С.С. Паляниця*

**Резюме.** Изучены особенности эмбрионального кроветворения у кроликов на разных стадиях гестации. Установлено, что в первом и втором триместрах беременности в эмбриональной печени и желчном пузыре имеет место выраженный гемопоэз с преобладанием эритропоэза.

Значительное количество недифференцированных и лимфоцитоподобных клеток, которые рассматриваются как пул стволовых и коммитированных клеток – предшественников всех ростков кроветворения обуславливает целесообразность получения клеточного трансплантата именно в первом и втором триместре.

**Ключевые слова:** эмбриональная печень, кроветворение, гестация, гемопоэз, эритропоэз.

## CHARACTERISTIC OF EMBRYONAL HEMATOGENESIS IN RABBITS

*R.V. Salutin, S.S. Paliaytsia*

**Abstract.** The features of embryonic hematogenesis in rabbits are studied at different stages of gestation. It is corroborated that in the first and second trimesters of pregnancy enhanced hemogenesis with the predominance of erythrogenesis, is observed in the embryonic liver and gallbladder. A significant number of undifferentiated and lymphocyte-like cells regarded as a pool of stem and committed cells-predecessors of all sprouts of hematogenesis, stipulate the expediency of receiving an active cellular transplant exactly in the first and second trimester.

**Key words:** embryonal liver, hematogenesis, gestation, hemogenesis, erythrogenesis.

Coordinating Center of Transplantating Organs, Tissues and Cells  
of the Ministry of Health Protection of Ukraine (Kyiv)

Рецензент – проф. Ю.С. Роговий

Buk. Med. Herald. – 2012. – Vol. 16, № 3 (63), part 1. – P. 91-94

Надійшла до редакції 08.06.2012 року