

The ultrastructural changes of the bone marrow in rats after experimental irradiation and xenogenic cerebrospinal fluid correction

A. I. Absettarova

Department of Anatomy, S. I. Georgievski State Medical University of the Crimea, Simferopol, Ukraine
Corresponding author: doctor-alie@rambler.ru. Manuscript received July 24, 2014; accepted October 06, 2014

Abstract

Background: Scientists have been dealing with the search and elaboration of radio protective factors since the middle of the previous century. One of the radio protective factors is the xenogenic cerebrospinal fluid.

Material and methods: The article is devoted to revealing and studying the morphological changes of the rats' bone marrow after parenteral injection of xenogenic cerebrospinal fluid (CSF) in different periods of postnatal development (newborn, immature, mature). Lactating cows aged 4-6 years were used as CSF donors. The effect of SCF was studied by electronic microscopy histological methods.

Results: In the article some results of the experiment on the influence of the xenogenic cerebrospinal fluid (XCSF) on the structure of the irradiated bone marrow of Wistar rats are shown. The evident radio protective effect was proved by the analyses of the destructive processes degree in red bone marrow cells of the rats exposed to total body radiation at 5 Gr and 3- and 10-times infusions of XCSF.

Conclusions: Findings testify to activating processes of regeneration of all sprouts of red marrow at the correction of consequences of irradiation by introduction of CSF. However the least degree of these processes manifestation is observed in the old age group, that is CSF, probably, with the decline of the activity of adaptation mechanisms.

Key words: bone marrow, cerebrospinal fluid, radiation.

Ультраструктурные изменения костного мозга крыс при экспериментальном лучевом поражении и его коррекцией ксеногенной цереброспинальной жидкостью

Введение

Поиском и разработкой радиопротекторных препаратов ученые занимаются с середины прошлого века [1, 2]. Их происхождение и механизмы действия разнообразны. Тем не менее, проблема остается достаточно острой, а разрешение ее – востребованным исследованием. Одним из рассматриваемых в качестве радиопротекторных средств является ксеногенная цереброспинальная жидкость (КЦСЖ), изучение биологических свойств которой ведется на базе кафедры нормальной анатомии Крымского государственного медицинского университета имени С. И. Георгиевского.

Физиологическая активность цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) определяется наличием широкого спектра биологически активных веществ [3]. На сегодняшний день накоплен значительный экспериментальный опыт применения КЦСЖ с целью коррекции раз-

нообразных патологических состояний [3]. Были показаны эффекты КЦСЖ на интактный костный мозг крыс [3]. Целенаправленного изучения влияния КЦСЖ на гипоплазированный костный мозг не проводилось. В связи с этим, данной работой планировали изучить морфофункциональные характеристики гипоплазированного костного мозга при коррекции ксеногенной цереброспинальной жидкости в возрастном аспекте.

Материал и методы

Эксперимент проведен на 144 белых крысах линии Wistar обоих полов 4 возрастных категорий: новорожденные, неполовозрелые (инфантильные), половозрелые (молодой репродуктивный возраст) и животные предстарческого возраста. Гипоплазия костного мозга достигалась тотальным однократным гамма-облучением животных в дозе 5 гр. на установке

«Тератрон» на базе КРУ «ОКД». В каждой возрастной группе после облучения 3-кратно или 10-кратно с интервалом в 2 дня вводили КЦСЖ, забор материала производили на 7-е, 14-е, 21-е и 30-е сутки.

Отбор и подготовку КЦСЖ к введению производили по методу, разработанному крымской ликворологической школой [3]. Материалом для исследования морфофункциональных изменений гипоплазированной костного мозга в возрастном аспекте контрольной и опытной серий служили бедренные кости крыс. Для анализа субклеточных изменений с помощью электронной микроскопии кусочки 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 абсолютный ацетон, материал заключали в смесь эпоксидных смол в капсулы. 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 ультрамикротомы ULTRACUT с последующим контрастированием уранилацетатом и цитратом свинца. Просмотр и фотографирование срезов производили на электронном микроскопе ПЕМ-106.

Результаты и их обсуждение

При ультрамикроскопическом исследовании I, II и III групп определялись выраженные изменения миелоидного ростка. Миелобласты имели крупные размеры, округлую форму с узким ободком цитоплазмы низкой электронной плотности, в которой располагалось небольшое количество органелл. Профили цистерн эндоплазматического ретикулаума выглядели расширенными, укороченными, количество рибосом, свободных и локализованных на поверхности ретикулаума – незначительно. Митохондрии этих клеток имели округлую форму, часть внутренних мембран была разрушена, вплоть до гомогенизации. Метамиелоциты в I возрастной группе облученных крыс содержали эксцентрично расположенное ядро бобовидной формы и большое количество специфических и неспецифических гранул. В некоторых клетках обнаруживались крупные вакуоли, содержащие цитоплазматическую жидкость. Промиелоциты всех классов в этих группах характеризовались различной степени выраженности деструктивными и дистрофическими изменениями. В некоторых клетках отмечались признаки апоптоза с конденсацией хроматина по периферии кариоплазмы в виде крупных глыбок, а также вакуолизация цитоплазмы. Большинство же клеток сохраняло нормальную структуру и высокую

активность белок-синтезирующего аппарата. Миелоциты в этих наблюдениях имели неправильную овальную форму, цитоплазма их содержала множество первичных и вторичных гранул.

Во II и III возрастных группах промежуточные формы миелоидных клеток содержали меньшее количество электронноплотных гранул. IV группа характеризовалась присоединением явлений внутриклеточного отека с расширением цистерн эндоплазматического ретикулаума и деструкцией митохондрий (рис. 1).

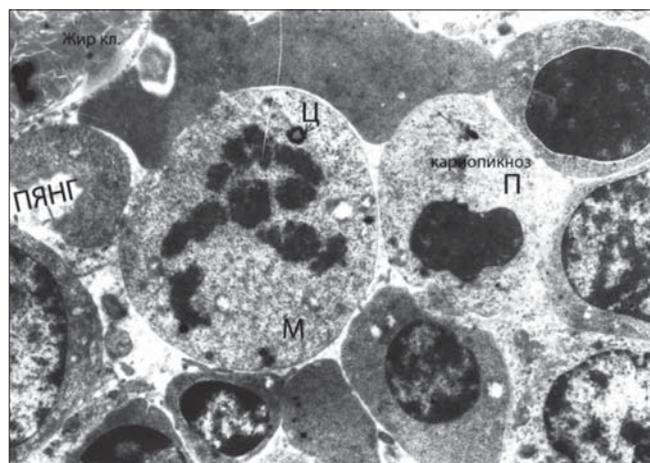


Рис. 1. Изменения ядерной структуры клеток. IV возрастная группа, 30 сутки эксперимента. М – митоз, Ц – центриоль, П – кариопикноз, ПЯНГ – палочкоядерный нейтрофильный гранулоцит. ТЭМ. Ув. x 3200.

Палочкоядерные и сегментоядерные гранулоциты характеризовались дезориентацией и дисконформацией внутренних мембран митохондрий, и относительным снижением количества вторичных гранул, на фоне сохранения нормальной структуры и электронной плотности ядра и расширением перинуклеарного пространства. В IV возрастной группе обнаруживались очаговые скопления клеточных обломков и апоптотические тельца. Весьма важным является повышение в этой группе активности фибробластов, со скоплением в межклеточном веществе хаотично расположенных пучков коллагеновых фибрилл. Ядра фибробластов имели неправильную овальную форму с множеством инвагинаций и скоплением хроматина в виде отдельных глыбок вблизи кариолеммы. Цитоплазма этих клеток содержала большое количество органелл, множественные цистерны цитоплазматической сети и хорошо развитый комплекс Гольджи.

Промиелоциты этой группы имели неправильную форму, бобовидной формы ядро с перинуклеарным просветлением, выраженной конденсацией хроматина, множественными цитоплазматическими вакуолями и гомогенизацией митохондриального матрикса. Однако, в тех же клетках обнаруживались овальной формы митохондрии с темным матриксом. Палочкоядерные и сегментоядерные гранулоциты имели типичное стро-

ение с умеренным снижением электронной плотности цитоплазмы, за счет уменьшения количества специфических гранул. Кроме того, в некоторых нейтрофильных гранулоцитах обнаруживались пикноз ядра, редукция цистерн эндоплазматического ретикулула, расширение перинуклеарного пространства.

Мегакариобласты в наблюдениях всех возрастных групп животных, подверженных сублетальным дозам облучения, встречались достаточно редко. Характеризовались большими размерами, около 35-40 мкм, содержали дольчатое ядро с нежным хроматином, распределенным по кариоплазме и очаговыми скоплениями его около кариолеммы в виде глыбок. Цитоплазма этих клеток содержала небольшое количество полисом, слабо развитую эндоплазматическую сеть и крупные округлой формы митохондрии с большей частью, разрушенными кристами. Мегакариоциты имели крупные размеры, округлую форму, содержали полиплоидное дольчатое ядро и обширную нежную сеть внутриклеточных структур. В перинуклеарной зоне обнаруживались комплекс Гольджи, а также расширенные цистерны гранулярной и гладкой цитоплазматической сети. В IV возрастной группе размеры мегакариоцитов были меньше, ядра характеризовались пикнотическими изменениями с конденсацией хроматина, митохондрии и другие мембранные структуры демонстрировали признаки внутриклеточного отека.

Моноциты всех возрастных групп в наших наблюдениях имели бобовидной формы ядро с крупным ядрышком и конденсацией хроматина возле кариолеммы. Цитоплазма содержала небольшое количество мелких осмиофильных гранул, расширенные профили гранулярной цитоплазматической сети, митохондрии округлой формы с дезинтеграцией внутренних мембран. На поверхности клетки микроворсинки деформированы, укорочены, а в некоторых наблюдениях полностью отсутствуют. Моноциты в исследуемом материале у крыс I-III возрастных групп содержали крупное эксцентрично расположенное неправильной формы ядро, с преобладанием гетерохроматина, множественные лизосомы, различного размера митохондрии с дезориентацией крист, мелкие вакуоли и хорошо развитый комплекс Гольджи. Для моноцитов IV возрастной группы были характерны более выраженные дистрофические изменения, отражавшиеся в уменьшении количества митохондрий, дисконкомплексации, вплоть до гомогенизации их внутренних мембран, появлении в цитоплазме крупных вакуолей.

Лимфобласты облученных крыс всех возрастных групп характеризовались округлой формы ядром, занимающим большую часть площади клетки с расширением перинуклеарного пространства, и крупными глыбками хроматина по периферии кариоплазмы. Часть лимфобластов имело пикнотизированное ядро, редуцированное количество органелл, внутриклеточные вакуоли и гомогенизацию митохондриального матрикса. Осо-

бенно часто такие клетки определялись в материале, полученном от крыс IV возрастной группы. Пролимфоциты, в количественном отношении, также как и лимфобласты, были немногочисленны, содержали округлые митохондрии с фрагментированными кристами, полисомы, вакуоли и расширенную гранулярную цитоплазматическую сеть, обедненную рибосомами. В ядрах малых лимфоцитов значительно преобладал гетерохроматин, цистерны шероховатой цитоплазматической сети были расширены, содержали мало рибосом на своей поверхности. Крупное овальной формы ядро плазмобласта занимало большую часть клетки, вокруг него выявлялось просветление перинуклеарного пространства, в цитоплазме хаотично располагались увеличенные митохондрии с дезориентированными внутренними мембранами. Гранулярная цитоплазматическая сеть занимала большую часть клетки, окружая в виде мишени, округлое ядро с глыбчатым хроматином. В перинуклеарном пространстве располагался хорошо развитый комплекс Гольджи.

Таким образом, у животных всех возрастных групп подверженных сублетальным дозам облучения наблюдалось выраженное угнетение костномозгового кроветворения. Обширные поля были заняты адипоцитами с гомогенной осмиофильной цитоплазмой и отнесенным к периферии овальной формы ядром. Наиболее выраженные миелодепрессивные изменения наблюдались в IV возрастной группе. Изменения наименьшей степени выраженности затронули эритроидный росток в котором, однако, отмечалось некоторое уменьшение количества эритробластов в окружении макрофага с явными признаками дистрофических изменений. Цитоплазма макрофагов содержала липидные вакуоли, множественные митохондрии округлой формы с дезориентацией и дисконкомплексацией крист, а также очаговой гомогенизацией их мембранных структур. Также обнаруживались фагосомы и лизосомы, различной электронной плотности и небольшое количество мелких гранул электронноплотного материала (ферритин). Цистерны гладкой цитоплазматической сети были расширены, частично фрагментированы, количество гранул на поверхности зернистой цитоплазматической сети было незначительным. Ядра макрофагов имели неправильную овальную форму с многочисленными инвагинациями и скоплением хроматина в виде глыбок по периферии кариолеммы. На поверхности этих клеток обнаруживалось небольшое количество микроворсинок.

Достаточно редко наблюдались проэритробласты содержащие крупное, округлой формы ядро с диффузно распределенным эухроматином и мелкими глыбками гетерохроматина. Базофильные эритробласты, располагавшиеся вокруг макрофага, характеризовались пикнотическими изменениями в ядре с конденсацией хроматина и глубокими инвагинациями кариолеммы. Цитоплазма этих клеток имела среднюю электронную плотность, содержала умеренное количество ор-

ганелл. Полихроматофильные эритробласты содержали крупные глыбки гетерохроматина занимавшие большую площадь ядра.

Ультраструктурные изменения красного костного мозга облученных крыс различных возрастных групп с коррекцией КЦСЖ, 30 сутки наблюдения.

Клетки костного мозга экспериментальной группы, в которой проводилось введение облученным крысам ксеногенной цереброспинальной жидкости, отличались преобладанием компенсаторно-приспособительных процессов над дистрофическими изменениями. Однако часть клеток все же имела признаки деструктивных процессов. К таким клеткам относились, прежде всего, наиболее радиочувствительные – лимфоциты различных поколений.

Макрофаги, в составе эритроидных ростков этой группы, имели более округлую форму, нежели в контрольных наблюдениях. Микроворсинки на их поверхности были мелкими и многочисленными. Ядра таких клеток характеризовались неправильной формой с конденсацией хроматина около кариолеммы, цитоплазма содержала большое количество органелл, лизосом и вторичных фагосом, а также большое количество мелких электронноплотных гранул. Цистерны цитоплазматического ретикулама выглядели расширенными, часть митохондрий имела округлую форму с разнонаправленными кристами и частичной фрагментацией внутренних мембран. Такие изменения свидетельствовали о высокой функциональной активности клеток.

Единичные проэритробласты содержали округлой формы крупное ядро с конденсированным по краю кариоплазмы хроматином и 2-3 ядрышками. Базофильные эритробласты экспериментальной группы имели округлое ядро со слабовыраженными инвагинациями, равномерно распределенным мелкодисперсным хроматином. Цитоплазма этих клеток содержала многочисленные полисомы и митохондрии округлой и/или овальной формы. В ряде наблюдений обнаруживались фигуры митоза.

Однако часть клеток сохраняла тенденцию к дегенеративным изменениям, что сопровождалось расширением перинуклеарного пространства и деструкцией крист митохондрий. Полихроматофильные эритробласты имели округлой формы ядро с большим количеством гетерохроматина. Среди клеток эритробластического островка обнаруживалась большое количество ретикулоцитов неправильной округлой формы с неомогенной цитоплазмой высокой электронной плотности, содержащей большое количество фрагментированного мембранного материала.

Миелоидный росток во II и III возрастных группах демонстрировал сходную ультрамикроскопическую картину. Среди переходных форм определялись делящиеся клетки с темной цитоплазмой и неправильной формы ядром. Миелобласты в экспериментальных наблюдениях сохраняли свою округлую форму и диффуз-

но распределенный эухроматин ядра. Органеллы этих клеток частично имели признаки интрацеллюлярного отека, с расширением цистерн гранулярного и агранулярного цитоплазматического ретикулама. Промиеоциты, как правило, имели овальную либо округлую форму ядра, умеренное количество внутриклеточных органелл, с некоторым просветлением цитоплазмы, а также изменением формы митохондрий и нарушением строения их внутренних мембран. Гранулы располагались по всей площади цитоплазмы. Миелоциты, в наших наблюдениях, имели эксцентрично расположенное ядро и цитоплазму, содержащую большое количество мелких гранул. Ядра палочкоядерных и сегментоядерных гранулоцитов имели характерную неправильную форму с конденсацией хроматина по периферии в виде пояса. Цитоплазма их содержала большое количество первичных и вторичных гранул и хорошо развитый комплекс Гольджи.

Мегакариобласты I возрастной группы животных, которым проводилась коррекция путем введения ксеногенной спинномозговой жидкости, имели округлой формы ядро с множественными инвагинациями и диффузно распределенным хроматином. В IV группе количество мегакариобластов было меньшим, однако строение их мало отличалось от других групп. Мегакариоциты экспериментального костного мозга содержали полиплоидное ядро с конденсацией хроматина по периферии кариоплазмы, хорошо развитый комплекс Гольджи в перинуклеарном пространстве, а также обширную сеть пузырьков и трубочек.

Во всех группах наблюдения обнаруживались фибробласты, имеющие вытянутую овальную форму и неправильной формы ядро с очаговыми скоплениями гетерохроматина по периферии кариоплазмы. В цитоплазме этих клеток располагались множественные крупные, овальные и округлые митохондрии с плотным матриксом и очаговой деструкцией крист, хорошо развитая сеть канальцев гранулярной цитоплазматической сети, очаги синтеза тропоколлагена.

Ядра промиоцитов всех возрастных групп имели бобовидную форму с крупным ядрышком и нежным эухроматином. Цитоплазма содержала мелкие электронноплотные гранулы, гранулярную цитоплазматическую сеть. Возле ядра располагался хорошо развитый комплекс Гольджи. Округлой формы митохондрии, в ряде случаев характеризовались дезинтеграцией и дезориентацией крист. На поверхности клетки обнаруживались длинные микроворсинки.

Красный костный мозг крыс I-III возрастных групп содержал крупные моноциты с эксцентрично расположенным неправильной формы ядром, конденсацией хроматина по периферии кариоплазмы, множественными лизосомами, овальными и округлой формы митохондриями с дезориентацией и дисконкомплексацией внутренних мембран. В перинуклеарном пространстве обнаруживался хорошо развитый комплекс Гольджи и

центриоли. В IV возрастной группе моноциты характеризовались расширением и просветлением перинуклеарного пространства, уменьшением количества внутриклеточных органелл. Пролимфоциты сохраняли гомогенную структуру эухроматина, с мелкими глыбками гетерохроматина, хорошо развитый гранулярный эндоплазматический ретикулум, множественные полисомы, рибосомы. Малые лимфоциты имели неправильной округлой формы ядро с инвагинацией, преобладанием гетерохроматина, скопление крупных светлых митохондрий на одном из полюсов клетки, большое количество свободных рибосом. Лимфобласты характеризовались крупным округлой формы ядром с преобладанием эухроматина и скоплением гетерохроматина возле кариолеммы. Цитоплазма содержала небольшое количество овальных митохондрий и расширенные цистерны шероховатого эндоплазматического ретикула. Ядро плазмобласта имело овальную форму с равномерно распределенным эухроматином, крупные овальные митохондрии располагались в цитоплазме хаотично, в них обнаруживались признаки разрушения внутренних мембран. В цитоплазме плазматической клетки был выявлен хорошо развитый комплекс Гольджи, массивная,

богатая рибосомами гранулярная цитоплазматическая сеть, окружавшая округлое ядро с множественными инвагинациями.

Выводы

Полученные данные свидетельствуют об активации регенераторных и усилении компенсаторных процессов всех ростков красного костного мозга при коррекции последствий облучения путем введения КЦСЖ. Однако наименьшую степень выраженности эти процессы имеют в IV возрастной группе, что связано, вероятно, со снижением активности адаптационных механизмов.

References

1. Vasilenko OI. Radiatsionnaya ekologiya [Radiation ecology]. M.: Medicina [Moscow: Medicine], 2004;216.
2. Kvacheva YuE. Apoptoticheskaya gibel kletok kostnogo mozga v vostanovitelnom periode ostroy luchevoj bolezni i ee rol v patogeneze gematologicheskogo sindroma [Apoptosis bone marrow cells in the rehabilitation period of acute radiation illness and its role in pathogenesis of hematological syndrome]. *Meditinskaya radiologiya i radiatsionnaya bezopasnost* [Medical radiology and radiation safety]. 2002;47(5):17-21.
3. Pikalyuk VS, Bessalova YeYu, Tkach VV, et al. Likvor kak gumoralnaya sreda organizma [Cerebrospinal fluid as a humoral environment of organism]. Simferopol: ARIAL, 2010;192.