

Академик АН УССР Р. Е. КАВЕЦКИЙ, Э. А. БУТЕНКО,
К. П. ЗАК, Э. В. КЛОЧКО, М. А. БАРАНОВСКИЙ

О ВОЗМОЖНОСТИ РАСПОЗНАВАНИЯ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

Известно, какие огромные перспективы для биологии и медицины таит в себе разгадка тайны гемопоэтических стволовых клеток (г.с.к.). Исключительную важность имеет их морфологическая идентификация и выяснение механизмов, контролирующих число и функции г.с.к. в организме для изучения лейкоза и других нарушений гемопоэза. Благодаря специально разработанной методике (1), основанной на подсчете колониеобразующих единиц в селезенке смертельно облученных мышей, в настоящее время имеется возможность исследовать количество г.с.к. в различных кроветворных органах, пути циркуляции в организме и влияние на них различных факторов. Однако, как выглядит г.с.к., какова ее морфологическая структура, остается пока невыясненным, что в значительной степени связано с низким их содержанием в костном мозге (к.м.) и других кроветворных органах.

В 1971—1973 гг. сделана (2, 3) первая серьезная попытка описания ультраструктуры г.с.к. к.м. животных и человека. Для увеличения содержания г.с.к. мышам вводили винбластин, а затем из к.м. получали путем дифференциального центрифугирования в градиенте плотности альбумина концентрат, содержащий до 20% клеток, способных к колониеобразованию.

В настоящей работе предпринята попытка морфологической идентификации г.с.к., но с использованием для увеличения их числа в к.м. оксимочевины (ОМ), вводимой по специально разработанной схеме. ОМ подавляет синтез ДНК в родоначальных кроветворных клетках, что сопровождается их гибелью. В результате этого после кратковременного снижения наступает увеличение числа г.с.к. в костном мозге (4, 5).

Исследования проведены на 140 мышах линии С₅₇В1 и BALB/c. Свежесинтезированную ОМ вводили животным 9 серий, по 15—18 мышей в каждой, 3 раза с 4,5-часовым интервалом в количестве 500 мг на 1 кг веса. Через 36 час. после последнего введения животных забивали и готовили суспензию костномозговых клеток. Часть клеток в количестве 10⁵ инъецировали в хвостовую вену летально облученным мышам для определения колониеобразующей способности (1). В контроле облученные животные получали такое же количество клеток к.м. интактных мышей. На 9 сутки извлекали селезенки и подсчитывали колонии. Другая часть клеточной суспензии к.м. шла на приготовление препаратов для световой и электронной микроскопии. В 3 сериях опытов костномозговая суспензия подвергалась дифференциальному центрифугированию в градиенте плотности альбумина (2, 6). Мазки клеток к.м. и фракции, обогащенной г.с.к. в 21% растворе альбумина, окрашивались по методу Май — Грюнвальд — Романовского.

Для электронной микроскопии клетки к.м. фиксировали 1,6% глутаральдегидом на какодилатном буфере (рН 7,2), затем дофиксировали 1% осмием на том же буфере, проводили через спирты восходящей крепости и окись пропилена и заключали в эпон (7). Срезы готовили на ультрамикротоме ЛКБ-8800, контрастировали уранил-ацетатом и цитратом свинца и просматривали в электронном микроскопе ДЖЕМ-7.

При исследовании препаратов в световом микроскопе через 36 час. после последнего введения ОМ отмечалось значительное увеличение в к.м. лимфоцитоподобных клеток — до 60%. Для большинства из них была характерна однородная структура ядра, наличие контурирующих ядрышек и отсутствие азурофильных гранул в цитоплазме. Отмечена закономерная корреляция между повышением процентного содержания лимфоцитоподобных клеток и увеличением колониеобразующей способности клеток к.м. мышей, получавших ОМ. Через 36 час. после введения ОМ количество колониеобразующих клеток к.м. мышей увеличивалось в 30—40 раз по сравнению с нормой.

При электронно-микроскопическом исследовании к.м., обладающего повышенной колониеобразующей способностью, и специальной фракции, содержащих, по данным световой микроскопии, большой процент лимфоцитоподобных клеток, было обнаружено, что многие из них имеют своеобразное строение и по своей ультраструктуре отличаются от лимфоцитов. В большинстве это клетки (рис. 1а, б) диаметром 8—10 мк с большим округлым ядром и нежным рисунком хроматина, сходным с таковым у «бластов». Гетерохроматин обычно сконденсирован только в виде узкой полосы, прилегающей к ядерной мембране, четко контурируют одно или два ядрышка. Цитоплазма содержит много свободных рибосом и отдельные полисомы, мелкие пузырьки и несколько малых округлых митохондрий. Элементы шероховатого эндоплазматического ретикулаума (ш.э.р.) отсутствуют или иногда представлены в виде отдельных небольших профилей. Зона Гольджи, мультивезикулярные тельца и лизосомы не обнаруживаются. Эти клетки подобны тем, которые описаны в (2, 3) и названы кандидатами в г.с.к.

Кроме того, нами были обнаружены моноклеары, которые по размерам и субмикроскопическому строению имеют определенное сходство с лимфоцитами. В отличие от лимфоцитов у них более тонкая структура хроматина ядра, очертания которого имеют фестончатый вид, иногда содержится ядрышко (рис. 1в, г). В цитоплазме отмечается большое число рибосом, маленьких везикул и отдельные небольшие округлые митохондрии. Элементы ш.э.р. представлены нерегулярно, зона Гольджи обычно отсутствует. Эти клетки по своему строению напоминают описанные в (8), сохраняющиеся при глубоком охлаждении суспензии к.м. мышей, когда большинство зрелых клеток разрушается, а колониеобразующие свойства остаются прежними.

Присуща ли ультраструктурная организация двух вышеописанных близких видов предполагаемых г.с.к. одной и той же клетке, находящейся на различных стадиях развития, или это разные клетки, в связи с комбинированием, сказать пока трудно.

На основании имеющихся данных можно считать, что предполагаемые г.с.к. являются моноклеарами с крупным ядром, часто содержащим одно-два ядрышка, и тонкой своеобразной структурой хроматина, варьирующей по рисунку, узким ободком цитоплазмы, содержащей большое число рибосом, несколько малых округлых митохондрий со слабым развитием элементов ш.э.р. при почти полном отсутствии зоны Гольджи, мультивезикулярных телец и лизосом.

Институт проблем онкологии
Академии наук УССР
Киев

Поступило
20 III 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ J. Till, E. McCulloch, *Radiation Res.*, v. 14, 213 (1961). ² D. W. van Bekkum, M. J. van Noord et al., *Blood*, v. 38, 547 (1971). ³ K. A. Dicke, M. J. Noord et al., *Blood*, v. 42, 195 (1973). ⁴ F. Vassort, E. Frindel, M. M. Tubiana, C. R., Ser. D, v. 267, 549 (1968). ⁵ F. Bohne, R. I. Haas et al., *J. Haemat.*, v. 19, 533 (1970). ⁶ K. A. Dicke, G. Tridente, D. W. van Bekkum, *Transplantation*, v. 8, 422 (1969). ⁷ J. H. Luft, *J. Biophys. and Biochem. Cytol.*, v. 9, 409 (1961). ⁸ A. S. Rubinstein, F. E. Trobaugh, *Blood*, v. 42, 61 (1973).

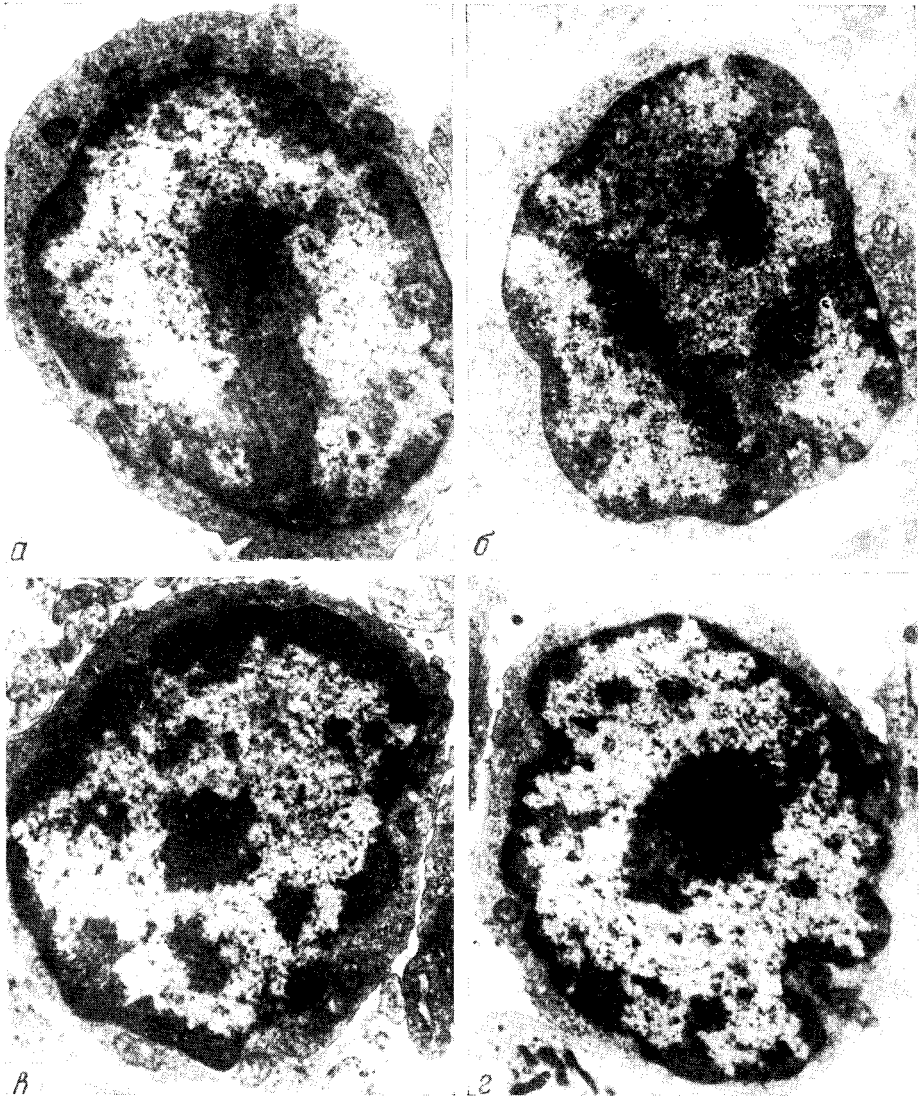


Рис. 1. а, б, в, г — ультраструктура предполагаемых гемопоэтических стволовых клеток костного мозга мышей. 8500×