

УДК 57.08:611.018.46:636.7

ДО МЕТОДИКИ ОТРИМАННЯ КІСТКОВОГО МОЗКУ У СОБАК

А. Й. Мазуркевич, М. О. Малюк, С. М. Ткаченко, Ю. О. Харкевич
nikolai_malyuk@ukr.net

Національний університет біоресурсів і природокористування України,
вул. Героїв оборони, 15; Київ, 03041, Україна

При виборі кістки для отримання кісткового мозку звертають увагу не лише на її розміри та розташування, а й на співвідношення в її будові губчастої та компактною кістковою тканини. У переліку кісток, придатних для відбору кісткового мозку у тварин, завдяки наявності в них переважно губчастою кістковою тканини, багатой на стовбурові елементи, в першу чергу, знаходяться груднина і клубова кістка. Як відомо, трубчасті кістки, окрім компактною кістковою тканини у ділянці епіфізів, побудовані також з губчастою кістковою тканини, яка складає їх основу та є джерелом стовбурових клітин.

Наведено результати удосконаленою методикою отримання кісткового мозку з губчастою кістковою тканини трубчастих кісток собак. При виборі кістки для відбору кісткового мозку та розробленні методикою його отримання, насамперед, керувались можливістю оперативного доступу, швидкістю його проведення, наявністю у кістці губчастою кістковою тканини, очікуваним об'ємом аспірату кісткового мозку, необхідністю післяопераційного догляду за твариною та ймовірністю виникнення ускладнень.

Встановлено, що правильний вибір місця отримання кісткового мозку (вид кістки, місце пункції) та методикою його отримання, в значній мірі, впливає на зручність виконання маніпуляцій, швидкість їх проведення, ступінь ушкодження м'яких тканин кінцівки тварини, необхідність застосування шовного матеріалу та післяопераційного догляду за твариною. Спосіб отримання кісткового мозку у ділянці проксимального епіфізу плечовою та дистального епіфізу стегновою кісток є доступним і простим у виконанні, забезпечує достатній об'єм аспірату, а виділені з нього клітини рівномірно розміщуються на дні чашок Петрі, набувають характерної фібробластоподібної морфології та активно проліферують.

Ключові слова: КІСТКОВИЙ МОЗОК, КІСТКОВА ТКАНИНА, ЕПІФІЗ, СТОВБУРОВІ КЛІТИНИ, МЕТОДИКА, ОПЕРАТИВНИЙ ДОСТУП

TO THE METHOD OF OBTAINING OF BONE MARROW IN DOGS

А. У. Mazurkevych, М. О. Malyuk, S. М. Tkachenko, I. О. Kharkevych
nikolai_malyuk@ukr.net

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine,
Heroiv Oborony st., 15; Kyiv, 03041, Ukraine

In selecting a bone for obtaining of bone marrow is paying attention not only size and location of bone, but also the correspondence in structure of spongy and compact tissue. In the list of bone, suitable for obtaining of bone marrow in animals, due to presence predominantly of cancellous bone tissue rich in stem elements, are primarily sternum and iliac bone. As are known, bones, besides the compact tissue, in the epiphyses area are built of cancellous tissue, which is their foundation and is also a source of stem cells.

The results of modification the method of obtaining of bone marrow from cancellous bones in small animals (for example, dogs) are presented.

In selecting a bone for obtaining of bone marrow and development of methods of obtaining it primarily guided by ability of surgical access and surgery performance, speed of implementation, presence

of cancellous tissue, expected volume of bone marrow aspirate, necessity of post-operative care of animals and probability of occurrence of different sorts of complications.

Established that choice of bone marrow (bone type, place of puncture) and method of obtaining affects on the convenience of manipulations, speed of their implementation, degree of soft tissues injury, need for suture material using and postoperative care of the animals. The method of obtaining of bone marrow in the area of proximal epiphysis of humerus and distal epiphysis of femoral bones is affordable and simple in execution, provides sufficient volume of aspirates.

Keywords: BONE MARROW, BONE TISSUE, STEM CELLS, METHOD, ACCESS

К МЕТОДИКЕ ПОЛУЧЕНИЯ КОСТНОГО МОЗГА У СОБАК

А. И. Мазуркевич, Н. А. Малюк, С. М. Ткаченко, Ю. А. Харкевич
nikolai_malyuk@ukr.net

Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины,
ул. Героев Обороны, 15; Киев, 03041, Украина

При выборе кости для получения костного мозга обращают внимание не только на ее размеры и расположение, но и на соотношение в ее строении губчатой и компактной костной ткани. В перечне костей, пригодных для отбора костного мозга у животных, благодаря наличию в них преимущественно губчатой костной ткани, богатой на стволовые элементы, в первую очередь находятся грудина и подвздошная кость. Как известно, трубчатые кости, кроме компактной костной ткани, в области эпифизов построены также из губчатой костной ткани, которая составляет их основу и является источником стволовых клеток.

Приведены результаты усовершенствованной методики получения костного мозга из губчатой костной ткани трубчатых костей собак. При выборе кости для отбора костного мозга и разработке методики его получения прежде всего руководствовались возможностью оперативного доступа, скоростью его проведения, наличием в кости губчатой костной ткани, ожидаемым объемом аспирата костного мозга, необходимостью послеоперационного ухода за животным и вероятностью возникновения осложнений.

Установлено, что правильный выбор места отбора костного мозга (вид кости, место пункции) и методики его получения в значительной степени влияет на удобство проведения манипуляций, быстроту их проведения, степень повреждения мягких тканей конечности животных, необходимости использования шовного материала и послеоперационного ухода за животным. Способ получения костного мозга в области проксимального эпифиза плечевой и дистального эпифиза бедренной костей является доступным и простым при проведении, обеспечивает достаточное количество аспирата, а выделенные из него клетки равномерно размещаются на дне чашек Петри, приобретают фибробластоподобную морфологию и активно пролиферируют.

Ключевые слова: КОСТНЫЙ МОЗГ, КОСТНАЯ ТКАНЬ, ЭПИФИЗ, СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ, МЕТОДИКА, ОПЕРАТИВНЫЙ ДОСТУП

Відбір кісткового мозку, як основного джерела стовбурових клітин, є основою біотехнологічних підходів отримання стовбурових клітин, оскільки саме кістковий мозок є основним їх джерелом [1, 2]. Вибір місця оперативного доступу визначається не лише вмістом в аспіраті кісткового мозку бажаної фракції клітин, а й складністю проведення

оперативного втручання, доступністю відповідної методики, необхідністю післяопераційного догляду за твариною та ймовірністю виникнення ускладнень. Не останнє місце у виборі методичного підходу щодо оперативного втручання при отриманні кісткового мозку має ступінь травматизації тварини (суттєве ушкодження м'яких тканин кінцівки).

При виборі кістки для відбору кісткового мозку звертають увагу не лише на її розміри та розташування, а й на співвідношення в її будові губчастої та компактної кісткової тканини.

У переліку кісток, придатних для відбору кісткового мозку у тварин, завдяки наявності в них переважно губчастої кісткової тканини, багатой на стовбурові елементи, в першу чергу, є груднина і клубова кістка. Проте маніпуляції щодо відбору кісткового мозку з цих кісток виконують переважно у великих тварин, зокрема коней [3–5].

Значного поширення набув метод отримання кісткового мозку з трубчастих кісток (стегнової, плечової тощо). При цьому, оперативне втручання проводиться в проксимально- та дистально-латеральній ділянках відповідних анатомічних структур. Цей метод вимагає пошарово розтину шкіри, підшкірної клітковини, фасції м'язів і самих м'язів до кістки з наступним свердлінням за допомогою свердла, отвору у компактній кістковій тканині. Недоліком цього способу є суттєве ушкодження м'яких тканин кінцівки, необхідність накладання швів і післяопераційного догляду за твариною [6].

Як відомо, трубчасті кістки, окрім компактної кісткової тканини у ділянці епіфізів, побудовані також з губчастої кісткової тканини, яка складає їх основу та є джерелом стовбурових клітин [7]. Разом з тим, у літературі відсутня інформація про методику отримання кісткового мозку у тварин, яка б характеризувалася низькою травматизацією тканин.

З огляду на це, метою роботи було розробити методику отримання кісткового мозку з губчастої кісткової тканини трубчастих кісток дрібних тварин (на прикладі собак), яка б характеризувалася простотою виконання, була нетривала з незначним ушкодженням м'яких тканин кінцівки, мінімальними витратами шовного матеріалу та необхідності післяопераційного догляду за твариною.

Експерименти на тваринах виконані у відповідності до «Загальних етичних

принципів експериментів на тваринах», схвалених I Національним конгресом з біоетики (20.09.04 р., Київ, Україна) і узгоджених з положеннями «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986).

Матеріали і методи

Досліди провели на безпородних собаках з вагою близько 10 кг.

З огляду на мету досліджень найбільш придатними місцями оперативного доступу є латеральна поверхня проксимального епіфізу плечової та дистального епіфізу стегнової кісток.

До оперативного втручання проводили седацию тварин з допомогою внутрішньом'язового введення ксилазин-ацепромазинової суміші з розрахунку 3 мг ксилазину та 1 мг ацепромазину на 1 кг маси тіла тварини. У місці оперативного доступу виконували інфільтраційну анестезію шкіри і підшкірної клітковини 0,5 % розчином новокаїну. Оперативне поле розміром 1,5×1,5 см вибривали та дворазово обробляли 5 % спиртовим розчином йоду, після чого шкіру у ділянці оперативного поля на півсантиметра зміщували в сторону та проколювали лезом скальпеля. Після цього голкою для кістково-мозкової пункції з мандреном проколювали м'які тканини, доходячи до окістя кістки. Помірним натисканням на голку з одночасними повільними пронаційними рухами просували голку в товщу губчастої кісткової тканини на 0,5–1 см. Виймали мандрен і до канюлі голки приєднували шприц об'ємом 10 см³ із гепарином (2–3 ОД на 1 см³). Аспірували кістковий мозок (рис. 1).

Після отримання кісткового мозку голку, не від'єднуючи від шприца, виймали, а до проколу шкіри (після її зміщення у попереднє положення) на 1–2 хв прикладали стерильний ватно-марлевий тампон. Після зупинки кровотечі шкіру в ділянці проколу обробляли 5 % спиртовим розчином йоду.



а



б

Рис. 1. Відбір кісткового мозку у ділянці проксимального епіфізу плечової (а) та дистального епіфізу стегнової (б) кісток

Отриманий аспірат кісткового мозку у 2 рази розбавляли фосфатним буферним розчином, нашаровували на попередньо внесений у стерильні пробірки розчин із градієнтом щільності $\rho=1,077$ (Histopaque) та центрифугували 25 хв при 300 g. За допомогою піпетки відбирали рідину, розташовану над фіколом у вигляді кільця. Отримані таким чином мононуклеарні клітини вносили в чашки Петрі та культивували при $t\ 37\ ^\circ\text{C}$ та 5 % вмісті CO_2 у культуральному середовищі: 80 % ДМЕМ; 20 % ембріональна сироватка теляти; 10 мкл/мл середовища антибіотик-антимікотик.

Результати й обговорення

Як свідчать результати досліджень для відбору кісткового мозку плечова та стегнова кістки дрібних тварин є найбільш оптимальними з-поміж інших трубчатих кісток, оскільки вони масивніші, а отже, у ділянці епіфізів містять більше губчастої кісткової тканини, що позначається на об'ємі аспірату кісткового мозку. Залежно від розміру кістки його об'єм з епіфізів плечової і стегнової кісток становив 5–7 мл (рис. 1).

Окрім цього, анатомо-топографічне розташування проксимального епіфізу плечової та дистального епіфізу стегнової кісток у поєднанні з проведенням усіх маніпуляцій з їх латеральної поверхні робить оперативний доступ нескладним.

Відсутність потреби у розрізі м'язих тканин (підшкірної клітковини, фасції

м'язів, м'язів) у ділянці оперативного доступу та необхідності накладати шви дозволяє менш травмувати тварину, скоротити тривалість оперативного втручання, а отже — мінімізувати затрати на препарати (наприклад, для седації) та післяопераційний догляд за твариною. Окрім цього, відбір кісткового мозку з голкою з мандреном позбавляє необхідності застосовувати механічну дріль.

При культивуванні стовбурових клітин кісткового мозку собаки, які отримані з проксимального епіфізу плечової та дистального епіфізу стегнової кісток, виявлено, що вони рівномірно прикріплюються на дні чашок Петрі, характерної фібробластоподібної морфології та активно проліферували (рис. 2 а, б). Візуальне спостереження за тваринами у післяопераційний період не виявило жодних відхилень в їх загальному стані, за винятком незначної кульгавості на оперовану кінцівку, яка зникла протягом 2–3 діб.

Таким чином, вибір місця для відбору кісткового мозку та методики його отримання у великій мірі визначає простоту виконання маніпуляцій, впливає на швидкість їх проведення, ступінь ушкодження м'язих тканин кінцівки тварини, необхідність застосування шовного матеріалу та післяопераційного догляду за твариною.

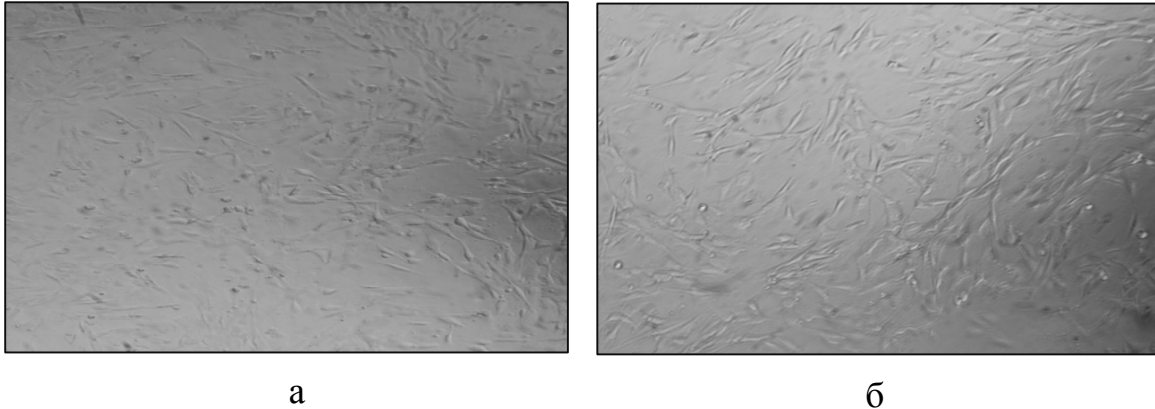


Рис. 2. Стівбурові клітини кісткового мозку собаки, отримані з проксимального епіфізу плечової (а) та дистального епіфізу стегнової (б) кісток, x100

Висновки

Спосіб отримання кісткового мозку у ділянці проксимального епіфізу плечової та дистального епіфізу стегнової кісток є доступним та простим у виконанні, забезпечує достатній об'єм аспірату.

Спосіб отримання кісткового мозку голкою є низькотравматичним для тварин і скорочує тривалість оперативного втручання.

Перспективи подальших досліджень. Дослідження будуть спрямовані на вивчення кількісних та якісних характеристик генетичного апарату мультипотентних стівбурових клітин кісткового мозку тварин за різних умов культивування *in vitro*.

1. Eslaminejad M. B., Nazarian H., Falahi F. et al. Ex vivo Expansion and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells from Goat Bone Marrow. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 2009, vol. 12, № 2, p. 70–79.

2. Igna C., Tanasie G., Schuszler L. et al. Techniques for dog bone marrow stromal cells sampling, culturing, differentiation and loading scaffolds. *Buletin USAMV-CN*, 2008, vol. 65, № 1–2, p. 5.

3. Adams M. K., Goodrich L. R., Raoeral S. Equine bone marrow-derived mesenchymal

stromal cells (BMDMSCs) from the ilium and sternum: Are there differences? *Equine Veterinary Journal*, 2013, vol. 45 (3), p. 372–375.

4. Delling U., Lindner K., Ribitsch I. et al. Comparison of bone marrow aspiration at the sternum and the tuber coxae in middle-aged horses. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 2012, vol. 76 (1), p. 52–56.

5. Kasashima Y., Ueno T., Tomita A. et al. Optimisation of bone marrow aspiration from the equine sternum for the safe recovery of mesenchymal stem cells. *Equine Veterinary Journal*, 2011, vol. 43 (3), p. 288–94.

6. Mazurkevych A. Y., Karpovskyi V. I., Malyuk M. O., Danilov V. B., Kovpak V. V., Kharkevych I. O., Sushko M. I. *Otrymannia, kultyvuvannia, kriokonservuvannia ta vykorystannia stovburovykh klityn tvarynnogo organizmu. Metodychni rekomendacii*. [Obtaining, cultivation, cryopreservation and use of stem cells of animal origin. Methodical recommendations]. Kyiv, 2010. 24 p. (In Ukrainian).

7. Pinero Eca Lilian, Renata Belmonte Ramalho, Isis Sousa Oliveira et al. Comparative study of technique to obtain stem cells from bone marrow collection between the iliac crest and the femoral epiphysis in rabbits. *Acta Cirurgica Brasileira Journal*, 2009, vol. 24, № 5, p. 400–404.

8. Folmerhauz B., Frevein I. *Anatomia sobaki i koshki* [Anatomy of dogs and cats]. Moskva, Akvarium Publ., 2003. P. 15 (in Russian).