

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**  
**ХЕРСОНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**  
**Факультет біології, географії і екології**  
**Кафедра біології людини та імунології**

**ВИВЧЕННЯ ПОКАЗНИКІВ ЧЕРВОНОГО КІСТКОВОГО**  
**МОЗКУ *IN VITRO***

Кваліфікаційна робота (проект)  
на здобуття ступеня вищої освіти «бакалавр»

Виконала: здобувачка 4 курсу 411 групи  
Спеціальності 091 Біологія  
Освітньо-професійної програми  
«Біологія»  
Маслій Вікторія Олегівна  
Керівник к.б.н., доцент Гасюк О.М.  
Рецензент к. б. н., доц. Головченко І. В.

Херсон – Івано-Франківськ - 2023

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП .....</b>	<b>3</b>
<b>РОЗДІЛ 1. Морфологія та функціональні особливості червоного кісткового мозку як головного органа кровотворення .....</b>	<b>5</b>
1.1. Історія вивчення червоного кісткового мозку .....	5
1.2. Будова і функції червоного кісткового мозку.....	8
1.2.1. Процес кровотворення.....	8
1.2.2. Морфофункціональна характеристика структурних елементів червоного кісткового мозку.....	11
<b>РОЗДІЛ 2. Сучасні підходи до вивчення червоного кісткового мозку .....</b>	<b>17</b>
2.1. Методи дослідження червоного кісткового мозку in vivo	17
2.2. Методи дослідження червоного кісткового мозку in vitro	20
<b>ВИСНОВКИ.....</b>	<b>32</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....</b>	<b>33</b>

## ВСТУП

Актуальність теми. Хвороби системи крові і органів кровотворення зокрема, досить поширені у сучасній Україні. Так, кількість таких захворювань сягає 5,6 – 4,9 на тисячу населення [2].

Дослідження червоного кісткового мозку важливо з кількох причин.

По-перше, червоний кістковий мозок є головним місцем утворення кровотворних клітин, таких як еритроцити, лейкоцити та тромбоцити. Розуміння процесів, що відбуваються в кістковому мозку, може допомогти у покращенні лікування різноманітних захворювань, пов'язаних з дефіцитом кровотворних клітин.

По-друге, кістковий мозок містить стовбурові клітини, які можуть бути використані для трансплантації крові, якщо пацієнт має проблеми з власним кровотворенням, наприклад, при лейкемії.

По-третє, дослідження червоного кісткового мозку може допомогти в розумінні інших аспектів біології, таких як диференціація клітин та розвиток ембріонів.

Отже, дослідження червоного кісткового мозку важливе для розуміння процесів утворення крові, лікування різноманітних захворювань та розвитку медичних технологій.

Ми вважаємо, що розширення основних відомостей про методи дослідження червоного кісткового мозку є актуальною та цікавою темою, яка буде мати практичне значення.

Мета дослідження. Вивчення показників червоного кісткового мозку *in vitro*.

Завдання дослідження:

1. Вивчити особливості червоного кісткового мозку як головного органа кровотворення;
2. Зробити ретроспективний аналіз вивчення червоного кісткового мозку;

3. Розглянути сучасні методи дослідження червоного кісткового мозку *in vivo*;

4. Розглянути сучасні методи дослідження червоного кісткового мозку *in vitro*.

Об'єкт дослідження. Методи дослідження функцій червоного кісткового мозку.

Предмет дослідження. Сучасні методи дослідження червоного кісткового мозку *in vitro*.

Методи дослідження. Огляд наукової літератури з теми кваліфікаційної роботи, ретроспективний аналіз, узагальнення вітчизняного та закордонного досвіду з означеної тематики.

Практична значущість результатів дослідження. Актуальні відомості щодо методів дослідження червоного кісткового мозку, які містяться у кваліфікаційній роботі, доцільно використовувати у роботі біолога-лаборанта. Також данні стануть у нагоді при викладанні вибіркового освітніх компонент «Клітинні основи кровотворення» та «Експериментальні методи дослідження в біології».

Апробація результатів дослідження. Результати, отримані в ході роботи по виконанню кваліфікаційного дослідження представлені на студентській конференції на кафедрі біології людини та імунології у 2023 році.

Структура роботи. Робота складається з трьох розділів, вступу, висновків та списку використаних джерел.

# РОЗДІЛ 1.

## МОРФОЛОГІЯ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНІ ОСОБЛИВОСТІ ЧЕРВОНОГО КІСТКОВОГО МОЗКУ ЯК ГОЛОВНОГО ОРГАНА КРОВОТВОРЕННЯ

### 1.1. Історія вивчення червоного кісткового мозку

Вивчення структурно-функціональних особливостей червоного кісткового мозку почалося ще в ХІХ столітті. У 1850 році французький вчений Ежен Одлон-Кантона провів дослідження на тваринах та запропонував поняття «червоний кістковий мозок» як позначення місця утворення кровотворних клітин [12].

Метод фарбування червоного кісткового мозку був винайдений в 1878 році німецьким гістологом Паулем Ерліхом (Paul Ehrlich). Він використовував спеціальну фарбу, яку він розробив самостійно, із використанням метиленового синього, щоб виділити клітини кровотворної тканини. Цей метод дав можливість дослідникам визначити, які клітини беруть участь у кровотворенні, та був першим кроком у розумінні складної структури крові [15].

Після винаходу методу фарбування червоного кісткового мозку Паулем Ерліхом, метод був подальше вдосконалений і модифікований іншими науковцями. Одним з таких науковців був Макс Асканазі (Max Askanazy), який у 1903 році запропонував використовувати більш чутливі фарби для виділення окремих клітин. Він також додав до процедури фарбування додаткові етапи обробки, які дозволяли отримувати більш детальну інформацію про склад крові [16].

Іншим науковцем, який вніс свій внесок у розвиток методів фарбування крові, був Джеймс Гоморі (James Ewing), який в 1901 році використовував спеціальну фарбу, яку назвав гематоксиліном, для виділення окремих структур у крові [14].

З часом, методи фарбування крові продовжували розвиватися, і сьогодні вони використовуються для діагностики різних захворювань крові та кісткового мозку, а також для дослідження механізмів кровотворення та імунної системи.

У 1892 році російський гістолог Александр Максимов провів перші експерименти з трансплантації червоного кісткового мозку у щурів, що відкрило нові можливості для лікування захворювань кровотворних органів [18]. Однак експериментально доведено існування такої клітини лише у 1961 році у дослідженнях канадських цитологів J. Till и E. McCulloch (рис. 1.1) [31].

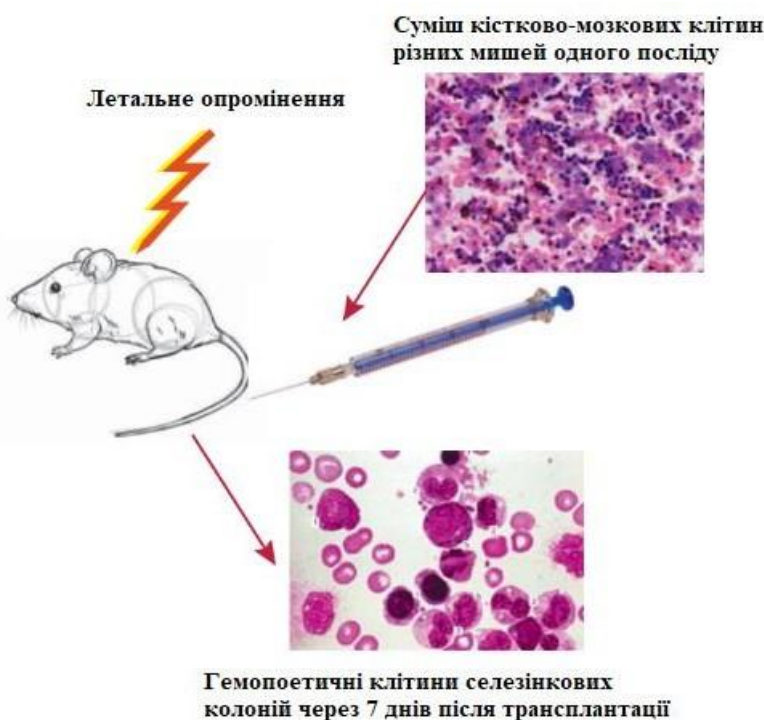


Рис. 1.1. Схема досліджу Till, J.E., McCulloch, E.A.

Пізніше, в 1920-х роках, вчений Арнольд Ріхтер провів дослідження червоного кісткового мозку на людях та запропонував метод отримання біоптатів з червоного кісткового мозку з допомогою спеціальних технік [34].

Згодом, в 1950-1960-х роках, вчені почали використовувати червоний кістковий мозок для трансплантації та лікування хворих на

лейкемію та інші кровотворні захворювання.

У 20 столітті вивчення кровотворення було однією з ключових галузей медицини. Було зроблено значний прогрес у розумінні процесів кровотворення, які були важливі для лікування різних захворювань, таких як анемія, лейкемія, гемофілія та інші [35].

У 1901 році Карл Ландштейнер відкрив систему груп крові, що дозволило розвивати трансфузійну медицину та збільшити ефективність лікування крововтрат. У 1928 році Фредерік Бантінг та Чарльз Бест відкрили ізольований гормон інсуліну, що дозволило лікувати діабет. В 1950-ті роки Ернест Маккалум і колеги відкрили, що гемоглобін складається з двох частин -  $\alpha$  і  $\beta$  - що привело до розуміння механізму гемоглобіну та його зв'язку з анемією [29, 4].

У 1960-х роках Е.Д. Томас та колеги описали структуру еритропоетину, гормону, який сприяє формуванню еритроцитів, що привело до розвитку нових лікарських засобів для лікування анемії. У 1970-х роках розроблено технологію отримання фактору згортання крові VIII, що стала першим ефективним лікуванням гемофілії [6].

У 1980-х роках відбулися значні прориви в генетиці, що дозволили розробити нові методи лікування гемофілії, лейкемії та інших захворювань. У 1990-х роках розпочалася розробка трансплантації кісткового мозку та створення клітинної терапії для лікування хворих на рак крові [27].

Сучасна схема кровотворення була розроблена на основі досліджень кількох вчених, включаючи Ернста Нойдвальда, Ернста Рюдигера, Карла Ландштейнера, Віллема Ейзенберга та ін.

Сучасна схема кровотворення складається з трьох основних етапів: еритропоез, лейкоцитопоез та тромбоцитопоез [20].

Еритропоез - це процес утворення еритроцитів (червоних кров'яних тілець) в кістковому мозку. Еритропоетин (ЕП), гормон, який виділяється нирками, стимулює продукцію еритроцитів. При нестачі кисню в крові,

наприклад, при анемії, виробляється більше еритропоєтину, що сприяє збільшенню кількості еритроцитів.

Лейкоцитопоез - це процес утворення лейкоцитів (білих кров'яних тілець) в кістковому мозку. Лейкоцити забезпечують імунну відповідь тіла, захищаючи організм від інфекцій та хвороб. Лейкоцити утворюються під впливом колонію-стимулюючих факторів, які регулюють різні етапи розвитку лейкоцитів.

Тромбоцитопоез - це процес утворення тромбоцитів (кров'яних пластинок) в кістковому мозку. Тромбоцити грають важливу роль у зупиненні кровотечів. Вони утворюються під впливом тромбопоєтину, гормону, який виділяється у печінці та нирках [5, 17].

Усі ці етапи кровотворення пов'язані між собою та регулюються різними гормонами та факторами росту. Розуміння сучасної схеми кровотворення допомагає лікарям при діагностиці та лікуванні різних захворювань крові та кісткового мозку.

У сучасний час, дослідження червоного кісткового мозку продовжуються, та використовуються для вивчення процесів кровотворення, розвитку та лікування кровотворних хвороб, а також для вивчення процесів старіння та імунної системи. Відкриття у галузі вивчення червоного кісткового мозку дали змогу розробити нові методи лікування та покращити якість життя людей, що хворі на кровотворні захворювання.

## **1.2. Будова і функції червоного кісткового мозку**

**1.2.1. Процес кровотворення.** Відповідно до сучасної схеми кровотворення, кров утворюється в кістковому мозку, який є основним органом кровотворення. Костний мозок містить гемопоетичні ствовові клітини, які диференціюються в еритроцитах, лейкоцитах і тромбоцитах.



Ці клітини потім потрапляють в кровотік і розподіляються по всьому організму [5].

Еритроцити (червоні кров'яні клітини) не містять кисню з легких до тканин організму і переносять вуглекислий газ із тканин до легких для виведення з організму. Лейкоцити (білі кров'яні клітини) відіграють важливу роль в імунній системі, захищаючи організм від бактерій, вірусів та інших збудників інфекцій. Тромбоцити відповідають за згортання крові і беруть участь в процесі загоєння ран.

Таким чином, сучасна схема кровотворення пояснює процес утворення крові в кістковому мозку та її розподіл по організму, а також типи різних кровотворних клітин у підтримці життєдіяльності організму.

Усі лімфоцити виникають із багатопотенційних гемопоетичних стовбурових клітин, які спочатку з'являються в жовтковому мішку ембріона, що розвивається, а пізніше виявляються в печінці плода. Кістковий мозок бере на себе цю роль, коли дитина народжується. Його можна вважати найбільшою тканиною тіла із загальною вагою від 1300 до 1500 г у дорослої людини.

Кістковий мозок заповнює серцевину всіх довгих кісток і є основним джерелом гемопоетичних стовбурових клітин, які розвиваються в еритроцити, гранулоцити, моноцити, тромбоцити та лімфоцити. Кожна з цих ліній має специфічні попередники, які походять від плюри потенціалу стовбурові клітини. Більшість експертів погоджується, що Т-, В- і НК-клітини виникають із загального попередника, відомого як загальний лімфоїдний попередник (CLP) (рис. 1.2). Попередники лімфоцитів розвиваються далі в первинних лімфоїдних органах [22, 24].

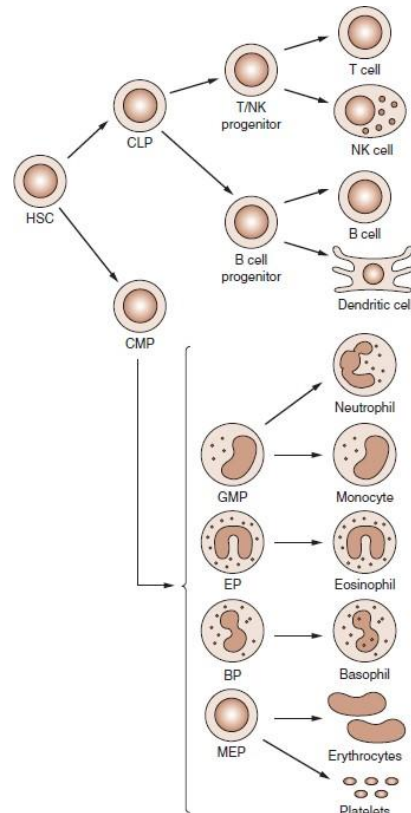


Рис. 1.2. Спрощена схема кровотворення [22].

У кістковому мозку гемопоетичні стовбурові клітини (HSC) утворюють дві різні лінії — загальний лімфоїдний попередник (CLP) і загальний мієлоїдний попередник (CMP). CLP дають початок Т/НК-клітинам-попередникам, які диференціюються в Т- і НК-клітини, і В-клітинам-попередникам, які стають В-клітинами та дендритними клітинами. CMP диференціюється на нейтрофіли, моноцити/макрофаги, еозинофіли, базофіли, еритроцити та тромбоцити

Кістковий мозок функціонує як антигеннезалежний центр лімфопоезу. Стовбурові клітини лімфоцитів вивільняються з кісткового мозку та переміщуються до додаткових первинних лімфоїдних органів, де відбувається подальше дозрівання. Одна частина прямує до тимуса і розвивається в Т-клітини. У людини дозрівання В-клітин відбувається в самому кістковому мозку. У периферичній крові приблизно від 10 до 20 відсотків усіх лімфоцитів є В-клітинами, від 61 до 89 відсотків — Т-клітинами і до 22 відсотків — НК-клітинами [22].

Сучасна схема кровотворення за Чертковим базується на його відкриттях в галузі гематології. Його схема описує процеси кровотворення та включає чотири основних стадії [21].

1. Процес ембріонального кровотворення, який відбувається в ембріональній жовчній кровотворній тканині (ембріональний моноцитарний агрегат).
2. Процес кровотворення в кістковому мозку, що відбувається в остеомієльовій зоні діяфізу кісток, залозистій та зернистій тканинах. На цьому етапі формуються всі клітини крові - еритроцити, лейкоцити та тромбоцити.
3. Функціональна зрілість клітин крові, яка відбувається в периферичних органах, таких як селезінка та лімфатичні вузли. На цьому етапі лейкоцити придбають здатність до сприйняття та знищення бактерій та інших інфекційних агентів.
4. Руйнування старих клітин крові та заміна їх новими. На цьому етапі відбувається руйнування старих еритроцитів у селезінці та заміна їх новими. Крім того, лейкоцити та тромбоцити також мають обмежений термін життя та замінюються новими клітинами крові [18].

**1.2.2. Морфофункціональна характеристика структурних елементів червоного кісткового мозку.** Кровотворна тканина міститься в груднині, хребцях, епіфізах трубчастих кісток, клепінні черепа та інших кістках, де є губчаста кісткова речовина. У новонародженого немовляти вміст кісткового мозку становить 1,4 % маси тіла і заповнює порожнини практично всіх трубчастих кісток. Коли дитина росте, маса кісткового мозку збільшується і становить 1,4 кг, проте, йде поступове його заміщення жировою тканиною в трубках трубчастих кісток. В губчастих кістках він зберігається протягом всього життя. У дорослої людини маса його складає 4,6 % маси тіла, червоний мозок становить 50 % загальної

його маси [13].

При комплексному вивченні морфологічних властивостей структури кісткового мозку виявлено, що кровотворна тканина представлена у всіх відділах стегнової кістки – кістковомозковому каналі діафізу та внутрішньотрабекулярному просторі епіфіза трабекулярної кістки. Паренхіма (центри кровотворних клітин) та строма у структурі кісткового мозку диференційовані, як і в будь-якому іншому органі. Стромальний компонент представлений кістковою, жировою та сполучною тканиною, судинами, ретикулярними волокнами та іншими типами клітин (рис. 1.3).

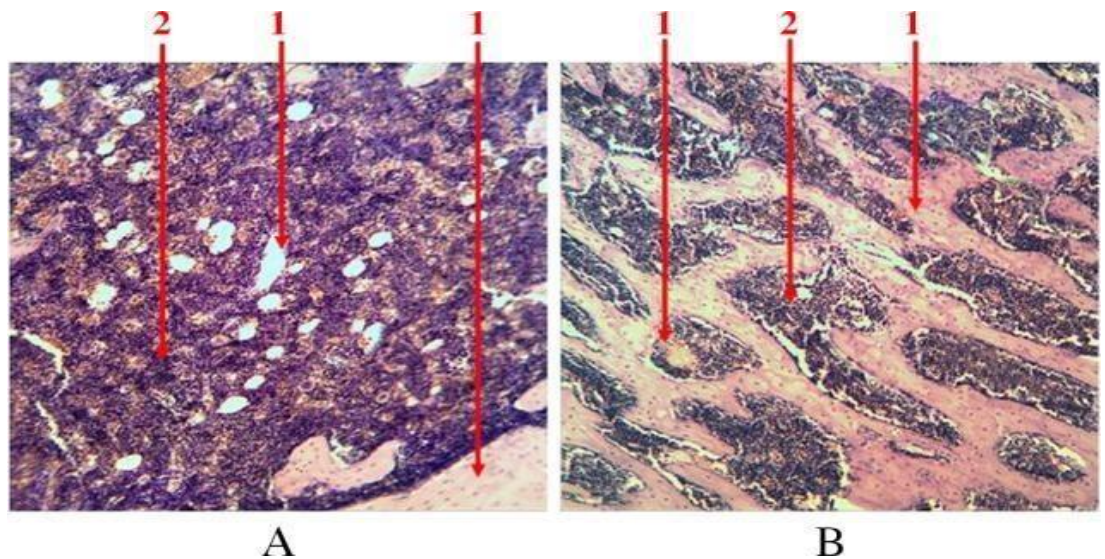


Рис. 1.3. Поздовжній зріз стегнової кістки щура [3, 28].

1 – строма, 2 – паренхіма. (А) область діафіза та (В) область епіфіза. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення 100×.

Компактна кісткова тканина є зовнішньою лінією кісткового мозку. У складі трабекулярної кістки вона також представлена у вигляді балок (трабекул), з'єднаних між собою у різних напрямках. Він має типову будову системи Гаверс і покритий шаром остеогенних клітин – ендостом (рис. 1.4). Перед кісткової тканини припадає  $48,8 \pm 3,3\%$  від загальної тканини у складі трабекулярної кістки.

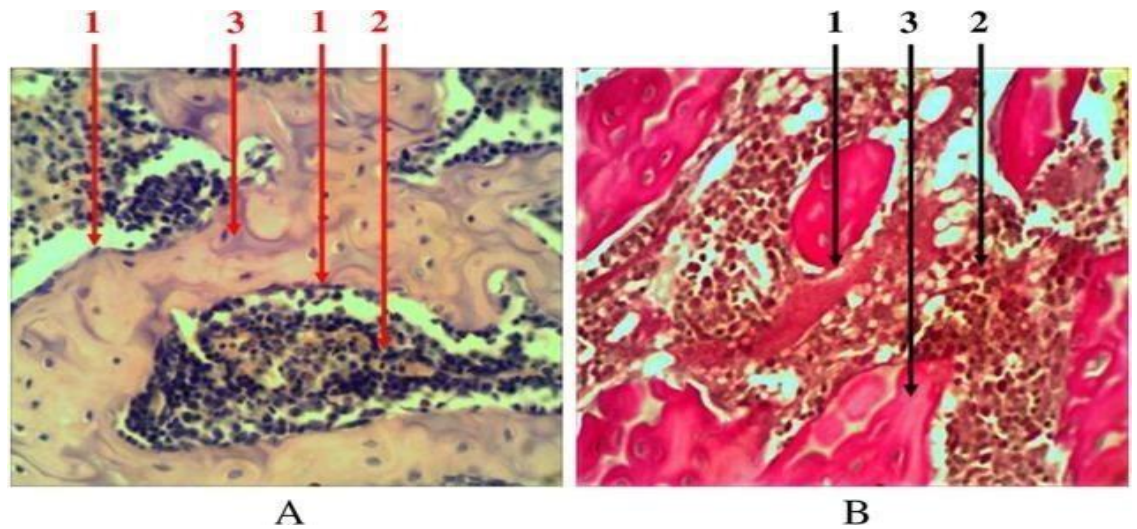


Рис. 1.4. Поздовжній зріз стегнової кістки щура [3, 28].

1 – ендост (остеогенні клітини); 2 – кровотворна тканина; 3 – кісткова тканина. (А) Фарбування гематоксиліном та еозином та (В) фарбування за Ван-Гізоном. Збільшення 400×

Кровотворна тканина у всіх відділах кісткового мозку пронизана великою кількістю кровоносних судин. Ці судини представлені висхідними і низхідними гілками артерії живлення і вени з розгалуженою мережею артеріол, що впадають у венозні синуси. Мережа променевих артерій, що відходять від кісткової артерії, проникає через кісткову тканину і впадає в ці синуси. Товстостінні судини добре помітні при гістологічному дослідженні зразків. Але значну кількість синусоїдів, представлених одним шаром ендотелію, за майже повної відсутності базальної мембрани, можна побачити лише при використанні додаткових методів фарбування тканин (рис. 1.5). Загальна площа, яку займає мережа кровоносних судин, становить  $18,7 \pm 2,1\%$ .

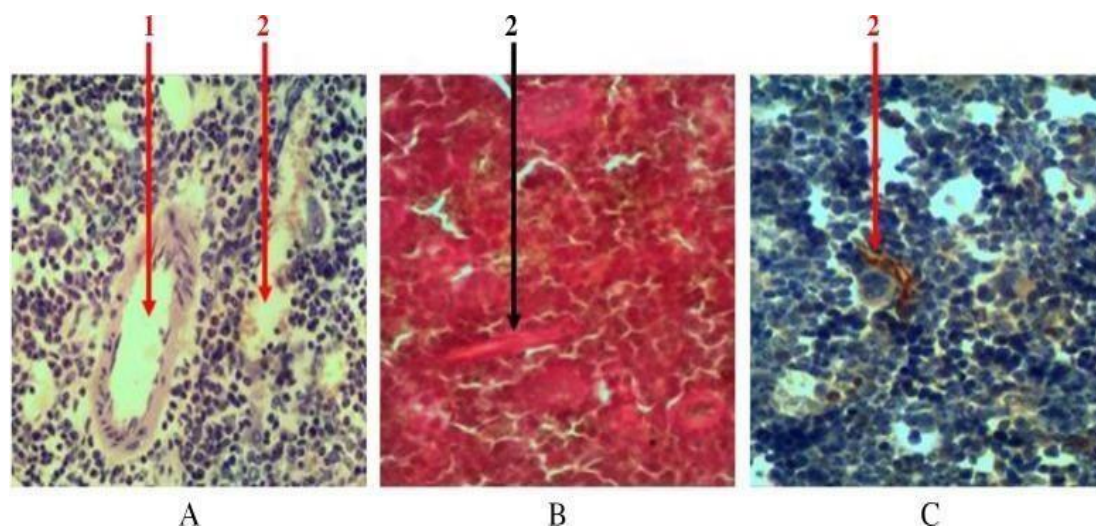


Рис. 1.5. Поперечний зріз стегнової кістки щура [3,28]..

1 – артеріолу, 2 – синусоїда. (А) Фарбування гематоксиліном та еозином, (В) фарбування за Ван-Гізоном та (С) імуногістохімічне дослідження рецептора цикліну D1. Збільшення 400×

У гістологічних препаратах, пофарбованих гематоксиліном та еозином, серед паренхіми кісткового мозку представлені одинично розсіяні та згруповані ліпоцити (жовтий кістковий мозок). Їх можна побачити у вигляді лакун із периферично розташованими ядрами (у вигляді кільця) (рис. 1.6А). У діяфіза стегнової кістки вони розташовуються в центрі та мають тенденцію до угруповання. Перед жирової тканини припадає  $11 \pm 2\%$  кісткового мозку.

Вся кровотворна тканина пронизана сполучними волокнами (колагеновими та еластичними), які служать їй своєрідним каркасом (рис. 1.6.Б). Вони практично непомітні при рутинних гістологічних дослідженнях, але виразно виявляються зі збільшенням їх кількості при гістохімічних та імуногістохімічних дослідженнях. Перед цих сполучних волокон припадає  $0,7 \pm 0,2\%$ .

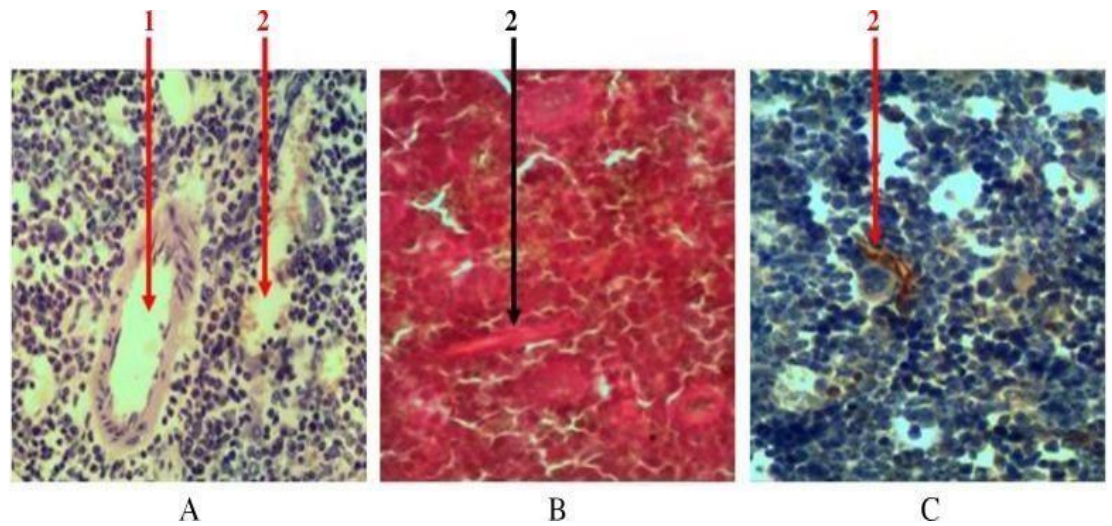


Рис. 1.6. Поздовжній зріз стегнової кістки щура.

1 – ліпозити, 2 – фіброзні волокна, 3 – опасисті клітини. (А) та (В) Фарбування гематоксиліном та еозином та (С) імуногістохімічне дослідження. Збільшення 400×

Індивідуальні опасисті клітини завжди представлені в тканині кісткового мозку. Вони мають круглу або овальну форму розміром від 4,5 до 15 мкм. У цитоплазмі є значна кількість гранул (розміром 0,25-2,5 мкм). Вони здатні продукувати, депонувати та секретувати біологічно активні речовини (гепарин, серотонін та ін), що впливають на морфофункціональний стан кровотворної тканини. При імуногістохімічному дослідженні внутрішньоклітинні гранули зв'язуються з діамінобензидином (рис. 1.6. С). Перед внутрішньоклітинних гранул доводиться трохи більше 0,1% від загальної кількості клітин [6].

Тож, загальний вигляд тканини червоного кісткового мозку є приблизно таким (рис. 1.7). Основні клітини-попередники, які містяться в червоному кістковому мозку, включають наступні [1]:

1. Гемоцитобласти - це найбільш ранні клітини, які можуть розвиватися в еритроцити, лейкоцити або тромбоцити.
2. Промієлоцити - це клітини-попередники, які можуть диференціюватися в моноцити та еозинофіли.

3. Мегакаріоцити - це великі клітини, що містять багато ядер і є попередниками тромбоцитів.
4. Еритробласти - це клітини-попередники, які розвиваються в еритроцити.
5. Лімфобласти - це клітини, які розвиваються в лімфоцити.
6. Мієлоїдні клітини-попередники - це клітини, які можуть диференціюватися в більшість видів лейкоцитів (нейтрофіли, еозинофіли, базофіли, моноцити).

Ці клітини-попередники проходять різні стадії диференціації, під час яких вони здатні трансформуватися в різні типи клітин крові.

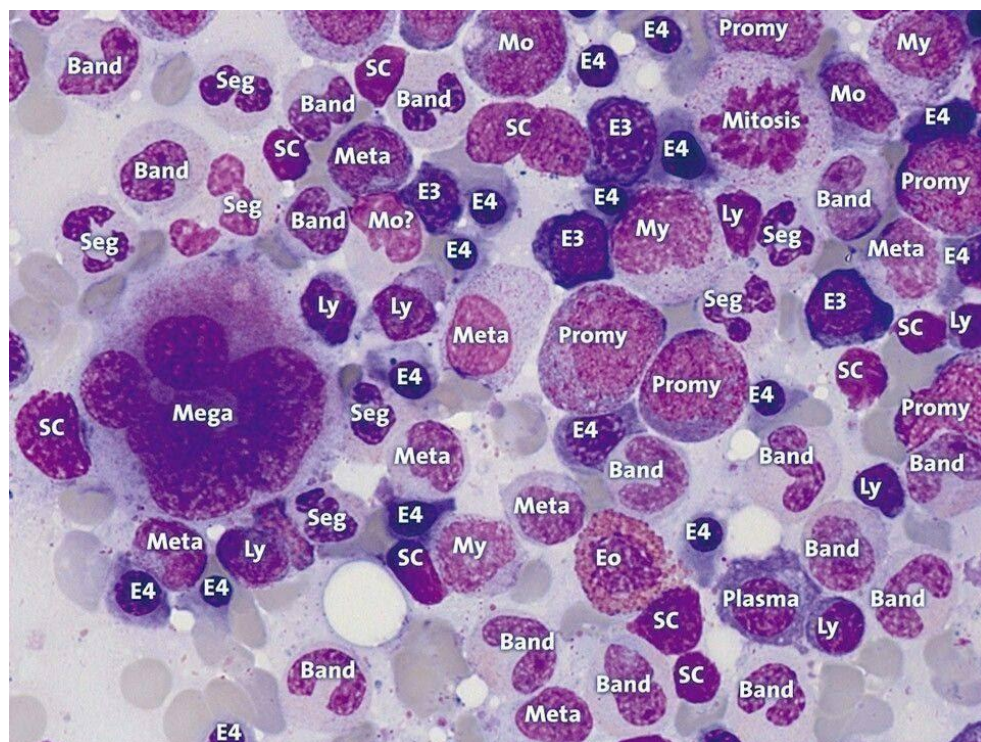


Рис. 1.7. Клітинний склад червоного кісткового мозку



## РОЗДІЛ 2.

### СУЧАСНІ ПІДХОДИ ДО ВИВЧЕННЯ ЧЕРВОНОГО КІСТКОВОГО МОЗКУ

#### 2.1. Методи дослідження червоного кісткового мозку *in vivo*

Дослідження кісткового мозку мають велике значення для діагностики та лікування різних захворювань, пов'язаних з формуванням клітин крові. Наведемо кілька прикладів захворювань, діагностика та лікування яких базуються на дослідженнях кісткового мозку:

1. Анемія (хвороба, пов'язана з недостатньою кількістю еритроцитів та/або гемоглобіну). Дослідження кісткового мозку може допомогти встановити причину анемії, наприклад, чи є порушення у формуванні еритроцитів, чи може це бути пов'язано зі зниженням кількості клітин-попередників.
2. Лейкемія - захворювання, пов'язане з надмірним утворенням лейкоцитів. Дослідження кісткового мозку може допомогти встановити тип лейкемії, що дозволить лікареві визначити оптимальну схему лікування.
3. Множинний мієлома - захворювання, яке виникає при порушенні розвитку клітин-попередників плазматичних клітин. Дослідження кісткового мозку допомагає встановити характер порушення та вибрати оптимальну терапію.
4. При метастазах злоякісних пухлин в кістки дослідження кісткового мозку може допомогти встановити, чи є поширення пухлини на кровоутворюючий орган, що важливо при виборі оптимальної стратегії лікування.

Існує велика кількість методів дослідження будови та функцій червоного кісткового мозку. Зокрема, можна виділити методи прижиттєвого дослідження (неінвазивні), методи дослідження після

смерті та дослідження біопунктату.

Дослідження червоного кісткового мозку *in vivo* можна проводити за допомогою багатьох методів.

**Магнітно-резонансна томографія (МРТ)** - це невразлива для організму метода діагностики, яка дозволяє отримати високоякісні зображення внутрішніх органів і тканин. Для дослідження кісткового мозку застосовуються спеціальні протоколи МРТ, такі як T1-weighted і T2-weighted зображення, дифузійна МРТ та конструкційна МРТ (рис. 2.1).

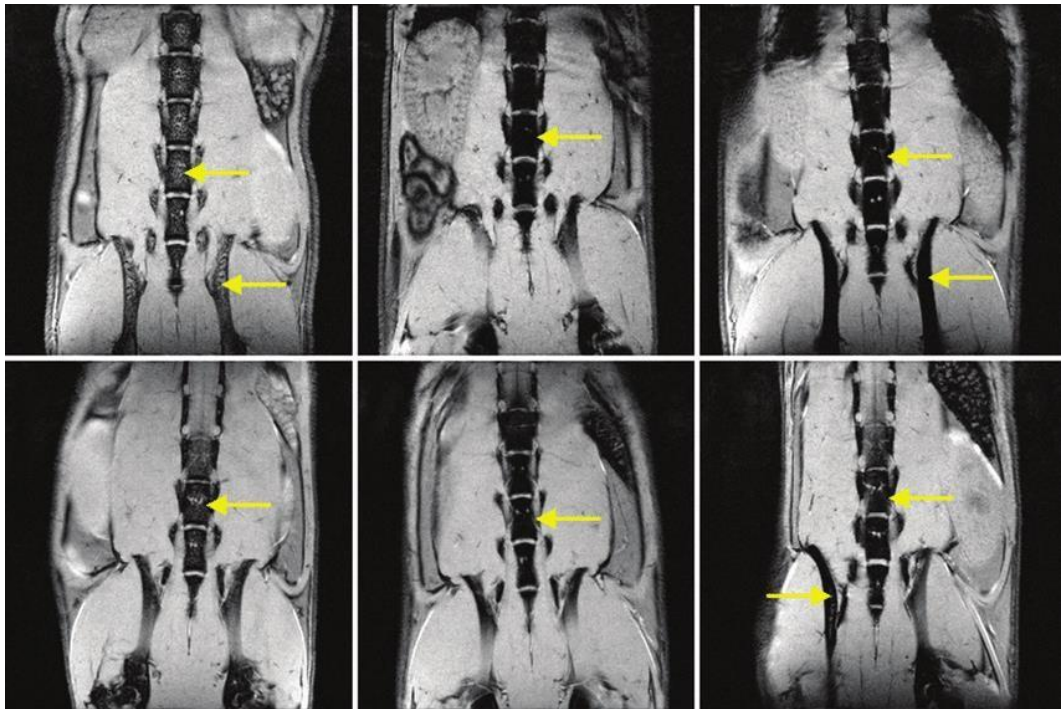


Рис. 2.1. Магнітно-резонансна томографія (МРТ) кісткового мозку миші до та після внутрішньовенного введення активної речовини (а–с) та нового суперпарамагнітного оксиду заліза (SPIO) (d–f). МРТ показує трабекулярну та клубову кістки в кожен часову точку: до (а, d), через 1 тиждень після (b, e), через 4 тижні після (с, f) введення. Жовті стрілки вказують на кістковий мозок (трабекулярна та клубова кістки) [32]

**Позитронно-емісійна томографія (PET)** - це метода діагностики, яка використовує радіоактивні речовини для візуалізації функціональної активності органів та тканин. Для дослідження кісткового мозку можна використовувати радіоактивні маркери, які проникають у кістковий мозок

та дозволяють візуалізувати його структуру та функцію (рис. 2.2).

По-перше: була отримана «комп'ютерна томографія КМ». Цілий хребет і кістки тазу, включаючи КМ, були автоматично виділені з КТ-зображень усього тіла за допомогою алгоритму екстракції кістки, реалізованого в аналізаторі для автоматичної сегментації кісток на основі мультитривимірні повністю згорткові мережі (3D-FCN) [23, 11].

Багатозадачна 3D-FCN для сегментації органів перевершила двовимірний підхід FCN [25], використовуючи дані з багатьох наборів даних сегментації, і показала покращення в порівнянні з одним Підхід 3D-FCN із завданням (a). Контурні лінії згодом були встановлені на 2 пікселі всередині першого рядка, що дозволило витягти ВМ і видалити якомога більше кортикальної кістки (b). Друге: накладення КТ кісткового мозку на ПЕТ всього тіла (c) і отримати «ПЕТ кісткового мозку», замаскований КТ кісткового мозку (d) [23, 11].

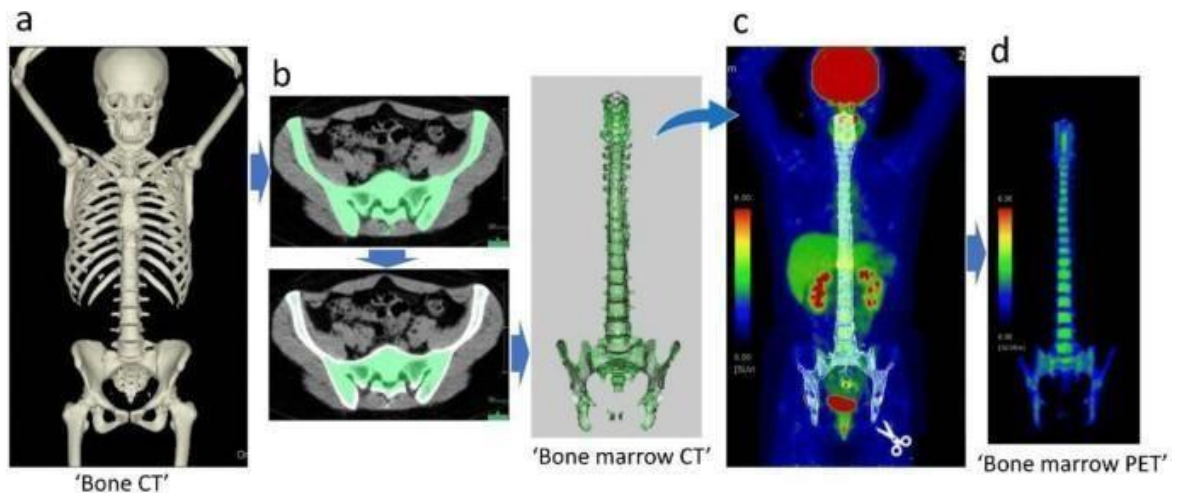


Рис. 2.2. Дві основні процедури для отримання позитронно-емісійної томографії кісткового мозку [23]

**Оптична когерентна томографія** - це метода дослідження, яка базується на вимірюванні зміни інтенсивності світла, яке відображається від тканин. Оптична когерентна томографія може дозволити візуалізувати мікроструктуру кісткового мозку, включаючи клітини, кровоносні судини та молекули (рис. 2.3).

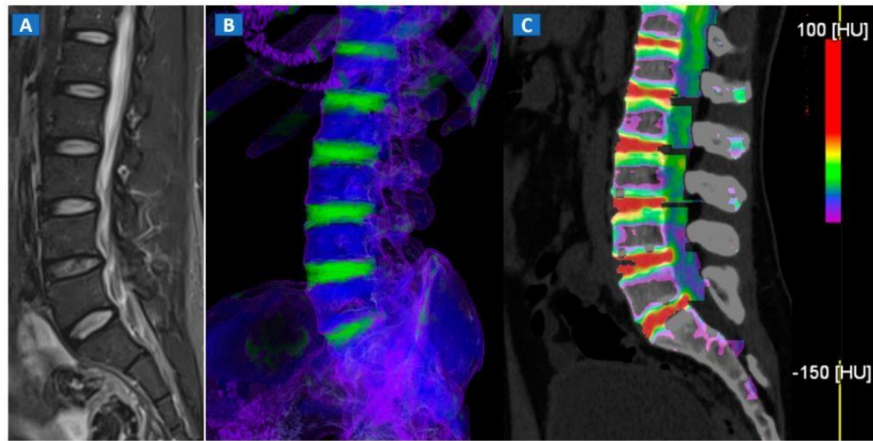


Рис. 2.3. Приклад оптичної когерентної томографії [8]

Приклад випадку з травматичним болем у попереку після падіння. На сагітальному стандартному КТ-зображенні 1 мм (А) неможливо визначити свіжий перелом. На корональному 3D-зображенні DECT (В) ВМЕ тіла хребця L1 закодовано зеленим кольором (товста стрілка), з деяким легким набряком, зображеним на верхній кінцевій пластині L2 (тонка стрілка). На сагітальному МРТ-зображенні STIR (С) підтверджено свіжий перелом тіла L1 із легким набряком, розташованим поблизу верхньої кінцевої пластинки (товста стрілка). На зображенні STIR MRI не видно ВМЕ тіла L2. На відповідному 2D DECT-зображенні (D) використовувався максимальний рівень накладання кольорових карт, щоб підтвердити наявність легкого набряку на тілі хребця L1 (товста стрілка) і виключити наявність значного набряку на L2 тіло (тонка стрілка), що дозволяє уникнути хибнопозитивного результату [8].

## 2.2. Методи дослідження червоного кісткового мозку *in vitro*

Перед застосуванням будь-якого метода дослідження кісткового мозку, необхідно його отримати.

Процедура отримання зразка кісткового мозку називається біопсією кісткового мозку. Це медична процедура, під час якої з внутрішньої частини кістки (найчастіше з таза, грудної клітки або гомілки) отримують

невеликий зразок кісткового мозку для подальшого дослідження [9].

Перед процедурою пацієнта можуть попросити здати кров на загальний тест, щоб переконатися відсутності кровотечі або знизити ризик виникнення ускладнень. Перед проведенням біопсії кісткового мозку пацієнт може отримати місцеву анестезію для зменшення болю.

Під час процедури лікар робить невеликий проріз в шкірі та вводить спеціальну голку в кістку. Потім він забирає маленький зразок кісткового мозку через голку. Зазвичай процедура займає близько 15-20 хвилин (рис. 2.4).

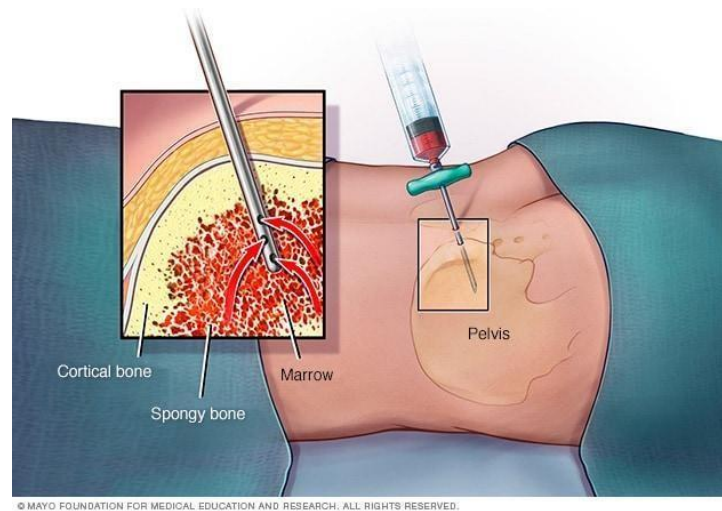


Рис. 2.4. Процедура отримання біоптату кісткового мозку [32]

Після процедури пацієнт може відчувати дискомфорт, біль або легку кровотечу в місці прорізу. У деяких випадках пацієнту можуть рекомендувати дотримуватися певних інструкцій, таких як не піднімати важкі речі або не займатися фізичними вправами на деякий час.

Для отримання кісткового мозку у мишей зазвичай використовують кілька основних методів (рис. 2.5).

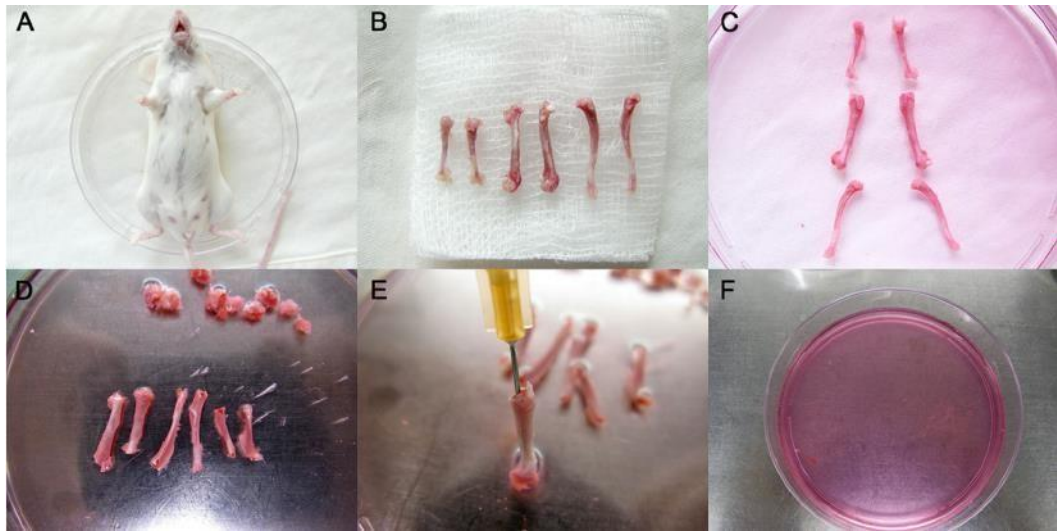


Рис. 2.5. Ілюстрації процедур збору клітин кісткового мозку миші [9]

(А) Миша була дкапітована, поміщена в 100-мм культуральний посуд і промита 70% (об./об.) етанолом протягом 2 хвилин. (В) гомілкові, стегнові та плечові кістки були розсічені; м'язи, зв'язки та сухожилля були видалені, а кістки перенесені на стерильну марлю. (С) Кістки переносили в 100-мм стерильну культуральну чашку з 10 мл повного мінімального необхідного середовища на льоду. (D) Чашку перенесли в камеру біозахисту і двічі промили, щоб змити домішки; два кінці трохи нижче кінця кістковомозкової порожнини були вирізані мікродиссекційними ножицями. (Е) Голка 23-го калібру була введена в кісткову порожнину та використана для повільного вимивання кісткового мозку. Кісткові порожнини промивали ще двічі, поки кістки не стали блідими. (F) Усі шматочки кісток видаляли з чаші, а жирову масу залишали в середовищі. Потім чашку інкубували при 37°C в 5% CO<sub>2</sub> інкубаторі [9].

**Екстракція за допомогою шприца:** цей метод полягає в тому, щоб використовувати шприц для видалення кісткового мозку з діафізу довгих кісток миші, таких як стегна або гомілки.

**Екстракція за допомогою резця:** цей метод використовується для отримання кісткового мозку з кісток черепа та тазу миші. Резець використовується для відкриття кістки та видалення кісткового мозку з внутрішньої частини.

**Використання культур кісткового мозку:** цей метод передбачає використання вже існуючих культур кісткового мозку миші для отримання необхідної кількості клітин для досліджень.

Існує два типи тестів, які можна виконати для дослідження кісткового мозку.

**Аспірація** – для аспірації використовується голка та відсмоктування для видалення невеликої кількості кісткового мозку [7]. Потім зразок тканини розкладають на предметному склі, щоб його можна було дослідити (рис. 2.6). Розсування тканини дозволяє вивчити розмір, форму та колір окремих клітин і підрахувати їх. Оскільки зразок розподілено на предметне скло, неможливо побачити, як клітини були організовані всередині кісткового мозку.

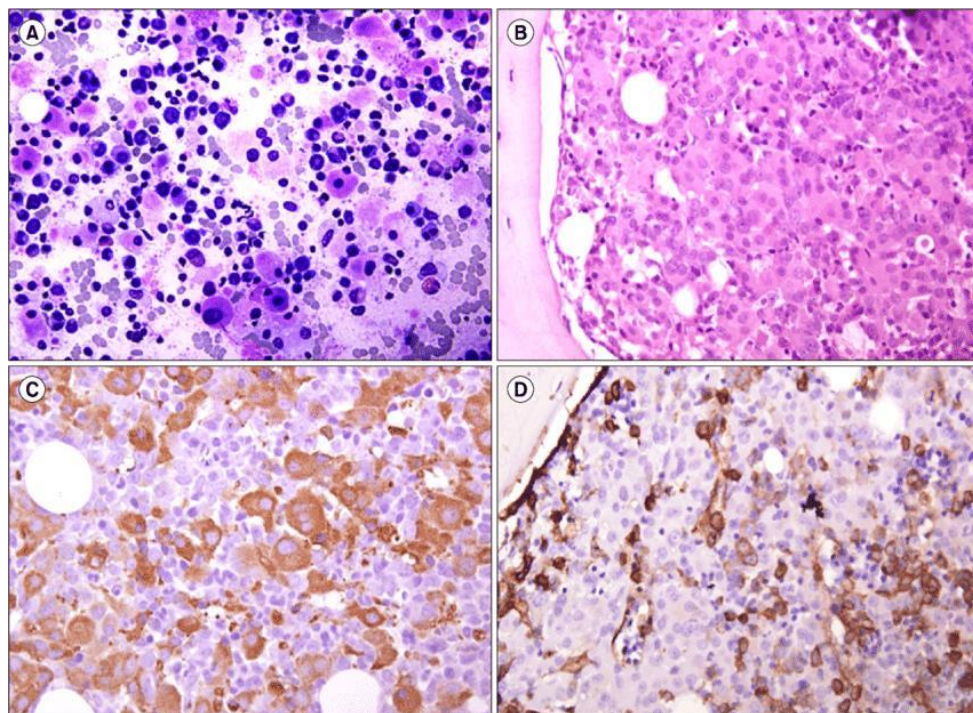


Рис. 2.6/ Зразки аспіраційної біопсії [7]

(А) Аспірація кісткового мозку, яка показує бласти з великою кількістю зернистої цитоплазми та малими везикулярними ядрами (Giemsa,  $\times 400$ ). (В) Біопсія кісткового мозку показала заміну гемопоетичних попередників бластами з везикулярними ядрами та помітними ядерцями (H & E,  $\times 400$ ). (С) Біопсія показала позитивні бласти

на CD 61 і (D) позитивні на CD34.

**Біопсія стрижневої голки** – під час біопсії стрижневої голки також використовується голка для видалення невеликої кількості кісткового мозку (рис. 2.7). Однак, на відміну від аспірату, зразок тканини при біопсії є суцільним шматком тканини, який необхідно розрізати на тонкі зрізи, перш ніж його можна досліджувати під мікроскопом [19].

На малюнку показана морфологія кісткового мозку чоловіка з панцитопенією внаслідок мегалобластної анемії. [19]. Мегалобласти з відкритим хроматином (a1), темно-червоним трепановим ядром (a2) і репрезентативну трепанову гістоморфологію (a3), що демонструє листи еритроїдних попередників з периферійними подовженими ядерцями, що прилягають до ядерної мембрани, настільки характерні для мегалобластів у мегалобластних анемія. Один мегакаріоцит (нижче) з розділенням ядерної частки. b Тверде, бліде, знебарвлене трепанове ядро та відповідна мікрофотографія випадку хронічної фази хронічного мієлоїдного лейкозу, що демонструє «рожевий зріз тканини» зі 100% клітинністю, мієлоїдною гіперплазією, аномальними (карликовими) мегакаріоцитами та помітно пригніченим еритроїдом острівці. c Значно аномальне (жовтувате, жирне) ядро трепану від чоловіка з важкою панцитопенією; і відповідні мікрофотографії, що демонструють виражену гіпоцелюлярність, пригнічений трилінійний кровотворення та майже повне заміщення жиру для діагностики апластичної анемії. d Твердий, блідий, знебарвлений лінійний стрижень трепанобіоптату чоловіка зі спленомегалією та панцитопенією, що демонструє гіпоцелюлярність кісткового мозку, остеомієлосклероз, потовщені неправильні кісткові трабекули та розширені синусоїди, що відповідає первинному мієлофіброзу.



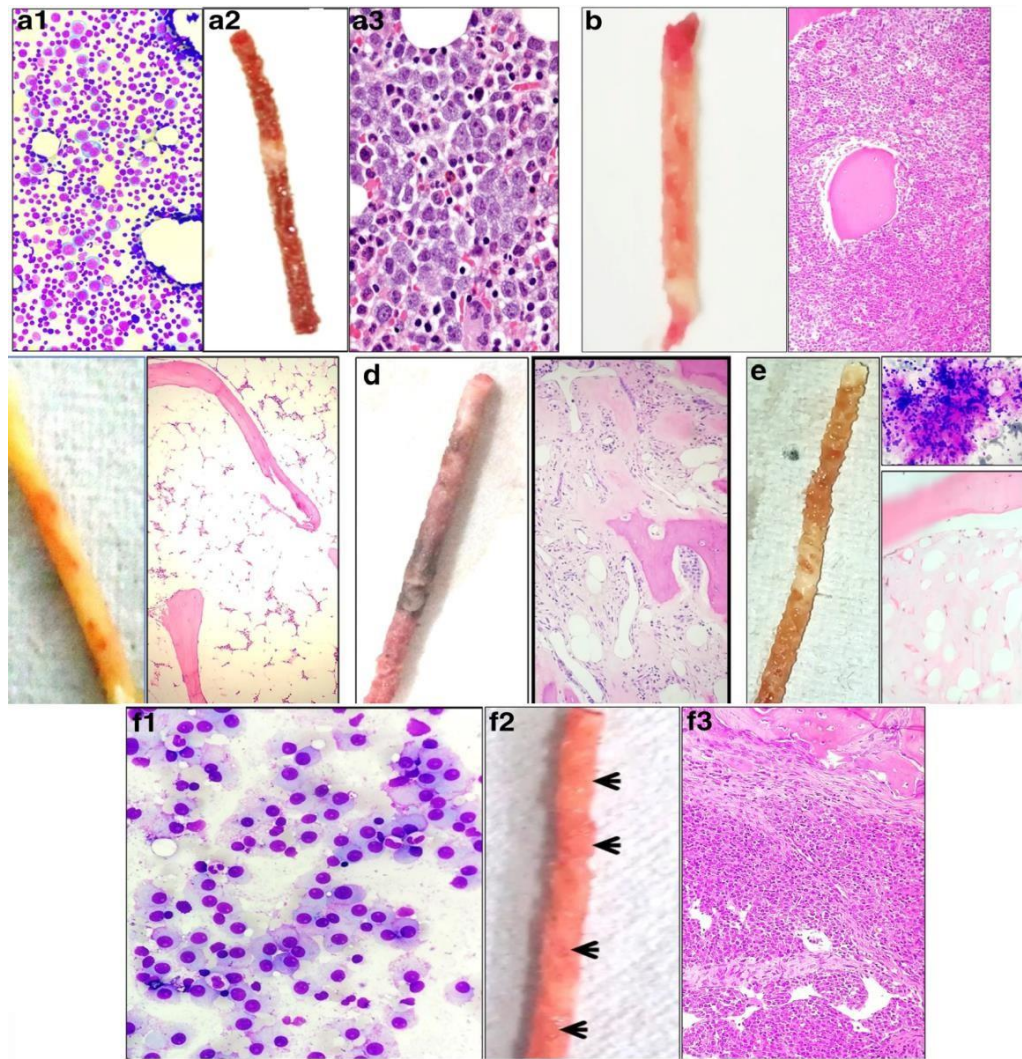


Рис. 2.7. Аномальні серцевини трепанів з відповідними морфологічними діагнозами [19]

Сильно аномальний лінійний стрижень трепанобіоптату чоловіка з тривалою лихоманкою та різкою втратою ваги внаслідок гострої пре-В-клітинної лімфобластної лімфоми (діагностованої з іншого боку), що демонструє численні крихітні порожнинні ділянки, що містять субстанцію, що виглядає як міксоїд. Зверніть увагу на аспірований мізерний, фібрилярний, міксоїдоподібний стромальний матрикс і відповідний трепановий зріз, що демонструє желатиноподібну трансформацію кісткового мозку. f Морфологія кісткового мозку у випадку множинної мієломи у жінки. Мазки аспірату кісткового мозку з випадку виявлення клітин мієломи з морфологією клітин вогнища.

Аномальне лінійне ядро трепанобіоптату з плямистими літичними ділянками (головка чорної стрілки) (f2); і репрезентативну гістологію трепану, що демонструє листи клітин мієломи з підвищеною остеокластичною активністю (верхній ліворуч). Клітини мієломи становили 80% ядерної диференціальної кількості кісткового мозку

Отже, пункційна біопсія краща для визначення організації кісткового мозку та того, як клітини злипаються. Крім того, деякі захворювання викликають фіброз кісткового мозку, що може ускладнити аспірацію клітин. У цій ситуації для дослідження кісткового мозку вирішальною є біопсія.

В цілому, біопсія кісткового мозку є досить безпечною процедурою, але як і в будь-якій медичній процедурі, існує ризик ускладнень, таких як кровотеча або інфекція. Тому важливо проводити процедуру тільки в спеціалізованому медичному закладі під наглядом досвідченого лікаря.

Метод біопсії кісткового мозку детально описаний у різних медичних публікаціях та книгах. Деякі з них ми рекомендуємо для ознайомлення з просвітницькою метою та для порівняння із існуючими протоколами:

1. "Bone marrow biopsy: a review" (Jaffe, ES., 2010) - ця стаття зосереджена на техніці біопсії кісткового мозку та її використанні у діагностиці різних захворювань [10].
2. "Bone marrow biopsy: a practical approach" (Hoyer, JD. et al., 2011) - ця стаття описує крок за кроком процедуру біопсії кісткового мозку та надає рекомендації щодо її проведення [Beham-Schmid].
3. "Bone marrow biopsy: a review of the clinical utility and complications" (Porphali, PA. et al., 2011) - ця стаття описує застосування біопсії кісткового мозку в діагностиці та лікуванні різних типів раку та інших захворювань [10].
4. "Riley, Roger et al (2004). A Pathologist's Perspective on Bone Marrow

Aspiration and Biopsy: I. Performing a Bone Marrow Examination. *Journal of clinical laboratory analysis*.. - ця стаття надає опис техніки проведення біопсії кісткового мозку, включаючи підготовку пацієнта, вибір місця для біопсії та виконання самої процедури [10].

5. "Beham-Schmid, C., & Schmitt-Graeff, A. (2020). *Bone Marrow Biopsy Pathology: A Practical Guide*. Springer Nature.) - ця книга описує роль біопсії кісткового мозку у діагностиці та лікуванні різних патологічних станів та надає огляд сучасних методів проведення біопсії [5].

**Мієлограмма** - це дослідження кісткового мозку, що здійснюється для діагностики різних захворювань крові. Метод розрахунку мієлограмми полягає в оцінці відносної кількості різних клітин у зразках кісткового мозку, які отримані шляхом біопсії.

Основні кроки методу розрахунку мієлограмми:

1. Отримання зразка кісткового мозку шляхом біопсії.
2. Підготовка зразка до мікроскопічного дослідження.
3. Визначення відносної кількості клітин у зразку, включаючи:
  - Мегакаріоцити (клітини, які формують тромбоцити).
  - Еритроїдні прекурсори (клітини, які формують еритроцити).
  - Гранулоцити (клітини, які формують гранулоцитарні лейкоцити).
  - Моноцити (клітини, які формують моноцитарні лейкоцити).
  - Лімфоцити (клітини, які формують лімфоцитарні лейкоцити) [].
4. Обчислення відносної кількості кожної з цих клітин у зразку.

Кількість клітин може бути визначена за допомогою лічильної камери або шляхом оцінки кількості клітин у визначеній кількості полів зору під мікроскопом. Для визначення точної відносної кількості клітин у зразку, рекомендується аналізувати кілька полів зору.

Отримані результати мієлограмми допомагають лікарю зрозуміти, які клітини кісткового мозку формуються нормально, а які можуть бути

відсутніми або зменшені в кількості внаслідок захворювань крові, таких як лейкемія або мієлодиспластичний синдром. Результати мієлограмми також допомагають встановити стадію захворювання та визначити план лікування.

Хоча метод розрахунку мієлограмми може бути корисним для діагностики захворювань крові, він має свої обмеження. Наприклад, він не може допомогти виявити рецидив захворювання або виявити підтипи певних клітин, які можуть бути важливими для планування лікування.

Також варто відзначити, що процедура отримання зразка кісткового мозку може бути досить болісною та може супроводжуватися ризиком ускладнень. Тому перед проведенням мієлограмми лікар завжди повинен розглянути переваги та недоліки процедури та визначити, чи є вона необхідною для конкретного пацієнта [8].

Методи дослідження, які будуть описані нижче, потребують використання біопунктатів.

Існує кілька методів дослідження червоного кісткового мозку *in vitro*. Розглянемо деякі з них.:

**Дослідження експресії генів.** Цей метод полягає у вивченні виразності різних генів у клітинах кісткового мозку за допомогою методів реал-тайм ПЛР або мікрочіпів генної експресії. Це дозволяє встановити, які гени активуються або пригнічуються у відповідь на різні фактори [10].

Рис. 2.8.

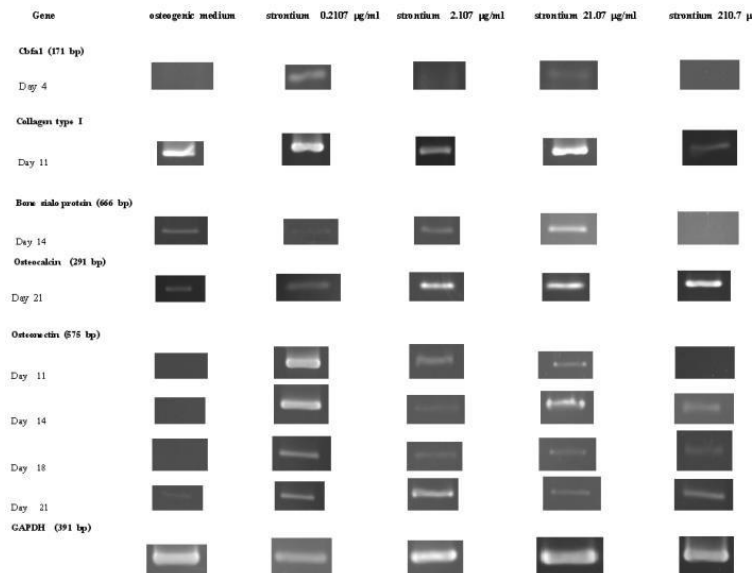


Рис. 2.8. Приклад. Експресія генів смуг RT-PCR, виявлена в hMSC та остеобластних клітинах. hMSC з кісткового мозку культивували в остеогенному середовищі без і з додаванням стронцію в різних концентраціях. Смуги RT-PCR кожного гена показані на малюнку лише в перший день виявлення культури клітин. Раннє виявлення *Cbfa1* було продемонстровано в експериментах з використанням стронцію 0,2107 мкг/мл і 21,07 мкг/мл на 4 день. Колаген типу I було виявлено на 11 день, кістковий сіалопротеїн на 14 день, остеокальцин на 21 день і остеонектин на 11 день [26]

**Аналіз білків.** Цей метод полягає у вимірюванні рівня різних білків, що присутні в кістковому мозку, за допомогою методів імунодетекції, таких як ELISA або Western blotting. Це дозволяє встановити, які білки виробляються клітинами кісткового мозку та як вони реагують на різні стимули (рис. 2.9).

**Культури клітин кісткового мозку.** Цей метод полягає у вирощуванні клітин кісткового мозку в контрольованих умовах у чашках Петрі або на мікротитрах. Культури клітин можуть бути використані для вивчення функції та диференціації клітин кісткового мозку, а також для оцінки впливу різних лікарських засобів на ці клітини [24].

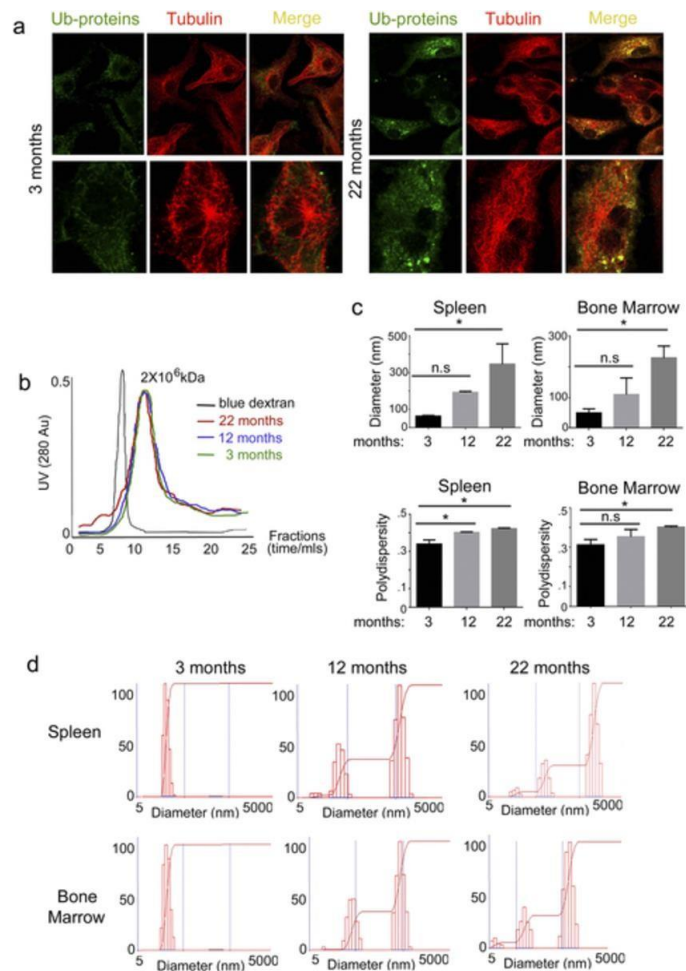


Рис. 2.9. Характеристика білкових агрегатів у кістковому мозку та селезінці мишей віком 3, 12 та 22 місяців. (а) Імунофлуоресцентний аналіз убіквітованих білкових агрегатів (Ub-білків), асоційованих з філаментами тубуліну в CD34+ клітинах кісткового мозку, зібраних із 3, 12 та 22 місячних мишей. (б) Ексклюзійна хроматографія CD34+ лізатів загального білка кісткового мозку, зібраних у мишей віком 3, 12 та 22 місячних. Показано один із трьох запусків; кожен цикл проводили з використанням лізатів від трьох незалежних мишей з кожної вікової групи. (с) Середній діаметр і полідисперсність білкових агрегатів, присутніх у загальних клітинних лізатах кісткового мозку та селезінки, зібраних у мишей віком 3, 12 та 22 місяців. Середнє значення та стандартне відхилення, розраховане з трьох окремих експериментів, кожен експеримент включав окремих мишей для кожної вікової групи. (д) Вимірювання динамічного світлорозсіювання білкових агрегатів, присутніх у кістковому мозку та селезінці загальних клітинних лізатів, зібраних у 3, 12 та 22 місячних мишей. Показано один із трьох експериментів. Кожен експеримент включав окремих мишей для кожної вікової групи [30]

У різні роки метод культивування клітин червоного кісткового мозку

досліджували багато вчених. Наведемо декілька з них. Ernest McCulloch та James Till - ці два канадських дослідники провели перші дослідження клітин кісткового мозку в 1960-х роках і відкрили, що ці клітини мають здатність до самовідтворення, що відкрило шлях для подальшого дослідження стовбурових клітин [31]. Також цю проблему вивчала Connie Eaves (канадська дослідниця), яка була одним з перших, хто використовував технології клонування для вивчення стовбурових клітин кісткового мозку та їхніх здібностей до диференціації в різні клітинні лінії. Великий внесок зробила Diane Krause - американська дослідниця, яка досліджувала культури клітин кісткового мозку та їх застосування в лікуванні різних захворювань. Також досліджує можливість використання клітин кісткового мозку для лікування хвороб крові Hal E. Broxmeyer (американський дослідник), який вивчає клітини кісткового мозку та їхні здібності до розвитку імунної системи. Назвемо також Igor Lemischka (українсько-американський дослідник), який досліджує стовбурові клітини, включаючи ті, що знаходяться в кістковому мозку. Він досліджує можливості застосування стовбурових клітин для лікування різних захворювань, включаючи онкологічні хвороби [33].

## ВИСНОВКИ

1. Червоний кістковий мозок є желеподібною речовиною, що представляє собою гемопоетично активну одиницю кісткового мозку. Він складається з ретикулярної строми сполучної тканини, спеціалізованих кровоносних судин, званих синусоїдальними капілярами, та мережі гемопоетичних клітин, званих гемопоетичними тяжами або острівцями. Червоний кістковий мозок удосталь міститься у всіх кістках у період внутрішньоутробного розвитку і в ранньому дитинстві, коли він займає кістковомозкову порожнину довгих кісток і дрібні порожнини губчастої кістки. Після 5-го року життя більшість червоного кісткового мозку поступово трансформується в жовтий кістковий мозок. У дорослих червоний кістковий мозок зберігається тільки в осьових плоских кістках (кістках черепа, ключицях, грудині, ребрах, лопатках, хребцях та тазі) та проксимальних кінцях кісток таза. плечова та стегнова кістки.
2. Червоний кістковий мозок містить плюрипотентні гемопоетичні клітини, які дають початок усім типам клітин крові, включаючи еритроцити, лімфоцити, гранулоцити, моноцити та тромбоцити. Продукція клітин крові в кістковому мозку регулюється відповідно до потреб організму під впливом різних ендогенних та екзогенних факторів. Крім того, червоний кістковий мозок також містить стовбурові клітини, які можуть виробляти інші тканини, крім клітин крові.
3. Дослідження червоного кісткового мозку мають вагомe значення для лікування та діагностики різних захворювань, пов'язаних з формуванням клітин крові. Одне з них *in vivo* проводиться за допомогою таких методів: магнітно-резонансна томографія; позитронно-емісійна томографія; оптична когерентна томографія;
4. Метод дослідження - *in vitro*. Цей метод полягає в тому, що виконання експерименту проводять у пробірці, тобто у контрольованому



середовищі поза живим організмом. Для нього характерні такі методи, як екстракція за допомогою шприца, резця, використання культур кісткового мозку. Тестують дослідження кісткового мозку за допомогою двох тестів: аспірація та біопсія( а саме стрижневої голки). Мієлограмма - це дослідження кісткового мозку, яка здійснюється для діагностики різних захворювань крові. Характерна методу *in vitro*.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Гістологія з основами гістологічної техніки / За редакцією В. П. Пішака. Підручник. — Київ: КОНДОР, 2008. — 400 с.
2. Державна служба статистики <https://ukrstat.gov.ua/>
3. Морфофункціональна організація червоного кісткового мозку щурів в нормі: монографія / Н.В. Борути, С.М. Білаш, В.І. Шепітько. – Полтава: ТОВ НВП «Укрпромторгсервіс», 2019.
4. Центр громадського здоров'я МОЗ України <https://www.phc.org.ua/>
5. Beham-Schmid, C., & Schmitt-Graeff, A. (2020). *Bone Marrow Biopsy Pathology: A Practical Guide*. Springer Nature.
6. Beutler, E. (2009). The history of erythrocyte sedimentation rate and its measurement. *Journal of Rheumatology*, 36(11), 2429-2430.
7. Bhattacharya, Jenna & Gupta, Richa & Samadhiya, Amit. (2017). Acute megakaryoblastic blast crisis as a presentation manifestation of chronic myelogenous leukemia. *Blood Research*. 52. 137-139. 10.5045/br.2017.52.2.137.
8. Foti G, Serra G, Iacono V, Zorzi C. Identification of Traumatic Bone Marrow Oedema: The Pearls and Pitfalls of Dual-Energy CT (DECT). *Tomography*. 2021; 7(3):424-433. <https://doi.org/10.3390/tomography7030037>
9. Huang, Shuo & Xu, Liangliang & Sun, Yuxin & Wu, Tianyi & Wang, Kuixing & Li, Gang. (2014). An improved protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. *Journal of Orthopaedic Translation*. 3. 10.1016/j.jot.2014.07.005.
10. Jaffe, E. S., Harris, N. L., Vardiman, J., Arber, D. A., & Campo, E. (2010). *Hematopathology e-book*. Elsevier Health Sciences. [https://books.google.com.ua/books?hl=uk&lr=&id=tlCcJz94rlkC&oi=fnd&pg=PP1&dq=Jaffe,+ES.+Bone+marrow+biopsy:+a+review+2010&ots=-zhblrWQ\\_g&sig=QxvWJxl4DWMYcQ-OsVzWeTt-](https://books.google.com.ua/books?hl=uk&lr=&id=tlCcJz94rlkC&oi=fnd&pg=PP1&dq=Jaffe,+ES.+Bone+marrow+biopsy:+a+review+2010&ots=-zhblrWQ_g&sig=QxvWJxl4DWMYcQ-OsVzWeTt-)

[IEc&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](#)

11. Keshwani D, Kitamura Y, Li Y. Computation of total kidney volume from CT images in autosomal dominant polycystic kidney disease using multitask 3D convolutional neural networks. In: Shi Y, Suk HI, Liu M, editors. Machine learning in medical imaging. Cham: Springer; 2018. p. 380–8
12. Lichtman, M. A. (2008). The origins of the hematology/oncology subspecialty: history, science, and personal reflections. *Blood*, 112(10), 3922-3935.
13. Luzzatto, L., & Notaro, R. (2009). The discovery of red blood cell enzymopathies: a tribute to the work of David B. Dacie. *Haematologica*, 94(9), 1196-1198.
14. Luzzatto, L., & Notaro, R. (2010). The history of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 44(4), 297-301.
15. Malcovati, L., & Cazzola, M. (2010). Modern methods of bone marrow analysis. *Blood*, 116(23), p. 30-39.
16. MaxAskanazy/ Режим доступа: <https://hls-dhs-dss.ch/de/articles/014276/2002-12-18/>
17. Nishino, M., & Jagannathan, J. P. (2014). New and developing diagnostic imaging techniques for evaluating the bone marrow. *Radiologic Clinics*, 52(4), 687-704.
18. Orkin S.H., Zon L.I. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*. 2008;132(4):631–44. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.025. [PMID 18295580](#). [doi:10.1016/j.cell.2008.01.025](#)
19. Padhi, S., Ravichandran, K., Varghese, R.G. et al. Bone marrow aspiration and gross appearance of trephine biopsy in routine practice: a preliminary descriptive data on 176 consecutive cases from a single tertiary care center in South India. *J Hematopathol* 14, 117–124 (2021). <https://doi.org/10.1007/s12308-021-00449-5>
20. Papaemmanuil, E., Gerstung, M., & Campbell, P. J. (2016). Somatic variant

- calling algorithms in the era of deep sequencing. *Cancer Journal*, 22(4), 256-262.
21. Papayannopoulou, T., & Craddock, C. (2018). Clinical applications of hematopoietic stem cell biology. *Journal of Clinical Investigation*, 128(9), 3815-3824.
22. Riley, Roger & Hogan, Thomas & Pavot, Dawn & Forysthe, Robert & Massey, Davis & Smith, Eileen & Wright, Lou & Ben-Ezra, Jonathan. (2004). A Pathologist's Perspective on Bone Marrow Aspiration and Biopsy: I. Performing a Bone Marrow Examination. *Journal of clinical laboratory analysis*. 18. 70-90. 10.1002/jcla.20008.
23. Satoh, Y., Funayama, S., Onishi, H. *et al.* Semi-automated histogram analysis of normal bone marrow using  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT: correlation with clinical indicators. *BMC Med Imaging* **22**, 31 (2022). <https://doi.org/10.1186/s12880-022-00757-x>
24. Scheiber AL, Clark CA, Kaito T, Iwamoto M, Horwitz EM, Kawasaki YI, Otsuru S. Culture Condition of Bone Marrow Stromal Cells Affects Quantity and Quality of the Extracellular Vesicles. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23(3):1017. <https://doi.org/10.3390/ijms23031017>
25. Sharma K, Rupprecht C, Caroli A, Aparicio MC, Remuzzi A, Baust M, et al. Automatic segmentation of kidneys using deep learning for total kidney volume quantification in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Sci Rep*. 2017;7:2049
26. Sila-Asna, M., Bunyaratvej, A., Maeda, S., Kitaguchi, H., & Bunyaratavej, N. (2007). Osteoblast differentiation and bone formation gene expression in strontium-inducing bone marrow mesenchymal stem cell. *Kobe J Med Sci*, 53(1-2), 25-35.
27. Singh, A. K., McGuire, T. R., & Corces, V. G. (2016). The genetics of blood cell formation and function. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 17, 47-80.

28. Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL (1988). Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* **241**: 58–62. [PMID 2898810](#). [doi:10.1126/science.2898810](#).
29. Stamatoyannopoulos, G. (2005). A brief history of hemoglobin research. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 34(3), 167-172.
30. Tanase, Maya & Urbanska, Aleksandra & Zolla, Valerio & Clement, Cristina & Huang, Liling & Morozova, Kateryna & Follo, Carlo & Goldberg, Michael & Roda, Barbara & Reschiglian, Pierluigi & Santambrogio, Laura. (2016). Role of Carbonyl Modifications on Aging-Associated Protein Aggregation. *Scientific reports*. 6. 19311. [10.1038/srep19311](#).
31. Till, J.E., McCulloch, E.A. (1961) A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiation Research* **14**:213-22.
32. Ting, Chen & Mori, Yuki & Inui-Yamamoto, Chizuko & Komai, Yutaka & Tago, Yoshiyuki & Yoshida, Shinichi & Takabatake, Yoshitsugu & Isaka, Yoshitaka & Ohno, Kohji & Yoshioka, Yoshichika. (2017). Polymer-brush-afforded SPIO Nanoparticles Show a Unique Biodistribution and MR Imaging Contrast in Mouse Organs. *Magnetic Resonance in Medical Sciences*. 16. [10.2463/mrms.mp.2016-0067](#).
33. Weatherall, D. J. (2010). The inherited diseases of hemoglobin are an emerging global health burden. *Blood*, 115(22), 4331-4336.
34. Wilson, C. S., & Davidson, B. L. (2016). Gene therapy for blood disorders: current status and future challenges. *Expert Review of Hematology*, 9(7), 665-677.
35. Wintrobe, M. M. (1985). Fifty years of hematology: the story of the American Society of Hematology. *New England Journal of Medicine*, 312(3), 156-160.