



УДК 612.017.11: 612.014.482.4

**ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА ИЗ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ТКАНЕЙ ПТИЦ
НА МОРФОЛОГИЮ БЕДРЕННОЙ КОСТИ МЫШЕЙ
ПРИ РАДИАЦИОННОЙ ИММУНОДЕПРЕССИИ**

**INFLUENCES OF EXTRACT FROM EMBRYONIC TISSUE
OF POULTRY ON THE MORPHOLOGY THIGH MICE WITH RADIATION
INDUCED IMMUNODEPRESSION**

М.С. Погорелая

*Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова Национальной академии медицинских наук Украины,
Украина, 61057, г. Харьков, ул. Пушkinsкая, 14
M.S. Pogorelaya*

I.I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of NAMS of Ukraine, 14 Puschkinskaya St, Kharkov, 61057, Ukraine

E-mail: marionimmun@gmail.com

Ключевые слова: γ -излучение, препарат из эмбриональных тканей птиц, костный мозг, костная ткань, мышца.

Key words: γ -radiation, low molecular weight avian embryonic tissues preparation, bone marrow, bone tissue.

Аннотация. Высокая чувствительность клеток костного мозга к действию ионизирующего излучения актуализирует поиск препаратов, оказывающих влияние на пролиферацию и дифференцировку клеток костного мозга после облучения. Работа посвящена изучению морфологии бедренной кости и костного мозга облученных животных при профилактическом парентеральном введении низкомолекулярного препарата из эмбриональных тканей птиц, являющегося потенциальным радиопротектором и иммуномодулятором с выраженными антиоксидантными, противовоспалительными и иммуностропными свойствами. На 7 и 14 сутки после воздействия однократного внешнего тотального γ -излучения в исследуемом органе выявлены выраженные признаки дистрофии стромы и паренхимы костного мозга и уплотнение структуры костной ткани. При профилактическом введении препарата из эмбриональных тканей птиц констатировали инициацию остеогенеза в костной ткани и процессов кроветворения в костном мозге мышей на 7 сутки после воздействия γ -излучения. На 14-е сутки после облучения в костной ткани и костном мозге животных данной группы наблюдали прогрессивные изменения в интенсивности гемопоэза, в частности, по показателю абсолютного числа ядросодержащих клеток, что и отличало данную опытную группу от группы сравнения. В отдельных сериях препаратов структура костного мозга соответствовала показателям физиологической нормы присущей данному виду и возрасту мышей.

Resume. Considering the high sensitivity of the bone marrow stem cells to ionizing radiation, it is important to search for drugs affecting the proliferation and differentiation of bone marrow cells after irradiation. Thereby, the morphology of femur and bone marrow of irradiated animals with preliminary introduction of low molecular weight drugs from embryonic tissues of birds was investigated.

The aim of our study was to analyze the morphological and functional characteristics of bone and bone marrow of mice when administered extract of chick embryos to the external common single exposure to γ -radiation.

The object studied were female albino mice weighing 22 ± 1.0 g, 2 months of age. The work has been used in the preparation of embryonic tissues of chickens produced by the technique developed in the Kharkov Academy of Animal Health. Total single external irradiation of mice was performed using RUM-17 at a dose of 5 Gy on the basis of the State Institution «Grigoriev Institute of Medical Radiology NAMS of Ukraine». Groups of animals (11 mice each): I group - intact animals; Group II - animals that were exposed to γ -radiation; Group III - animals which were administered the preparation at a dose of 0,1 mg/kg each alternate day 5 times and irradiated after administration. The study of the marrow of femur was performed after 7 and 14 days after exposure to radiation. Workings with animals were in accordance with the ethical standards of behavior with laboratory animals.

In animals exposed to total body irradiation on the 7th day of the experiment, bone revealed distinct signs of degeneration of the stroma and parenchyma. It was also noted a thinning and bone resorption, structural changes of the stromal microenvironment of the femur, which is expressed in hematopoietic tissue hypoplasia, were especially demonstrated. In the medullary cavity of the bone cavities and gaps are identified, channels osteons narrowed compared with samples taken from intact mice, and generally decreased activity of bone formation. On the 14th day after irradiation there was observed a thickening of the compact substance shaft that was due to increase in the number osteons channels have a larger diameter. Marked nuclear deformation in bone osteocytes and bone as a whole parenchyma of the control group of animals were a severe degenerative changes. Also in this group of animals to the 14th day of the experiment to reduce the background activity of reducing the number of hematopoietic it was noted reticular fabric which is normally found in the form of thin oxyphylic layers. However, comparatively more marked erythroid cell were identified by the hyperchromic color hematopoietic cells. In control mice, the bone growth was detected adipose tissue - increase in the number of adipocytes. Thus, the histological study of bone tissue of animals after total body irradiation indicates expressed violations of parenchymal-stromal relationships in hematopoietic tissue spongy substance of the femur. In turn, it is known that the relationship between the stroma-parenchyma in the hematopoietic system is the basis for the development and maturation of myeloid and lymphoid cells in normal.

There was stated the initiation of osteogenesis and the processes of hematopoiesis in the bone marrow of irradiated animals at the 7th day after exposure to γ -radiation at a dose of 5 Gr during prophylactic administration of avian embryonic tissue preparation. On the 14th day of irradiation the progressive changes in comparison to control group were observed in the bone marrow of irradiated animals which were administered avian embryonic tissues preparation, and in some locations the bone marrow didn't differ from norm.



Введение

Известно, что костный мозг играет важную роль в формировании гемопoэтической ниши [Шибкова и др., 2006; Mendez-Ferrer et al, 2010; Nagasawa et al, 2012] и его морфологическое состояние является одним из главных критериев в оценке действия облучения на организм [Шибкова и др., 2006]. В частности, однократное локальное облучение костного мозга в дозе 5–10 Гр вызывает тяжелую гипоплазию, расширение и уменьшение костномозговых синусоидов. Облучение в дозе 20 Гр вызывает хроническую аплазию и замещение костного мозга жировой и фиброзной тканями. Более высокие однократные дозы облучения вызывают фиброзное перерождение костного мозга, которое не имеет обратного развития даже после трансплантации костномозговых стволовых клеток [Tokoyoda et al., 2004].

Учитывая высокую чувствительность стволовых клеток костного мозга к действию ионизирующего излучения, актуальным является поиск препаратов, оказывающих влияние на пролиферацию и дифференцировку клеток костного мозга после облучения. В связи с этим, представляет интерес изучение морфологии бедренной кости облученных животных после предварительного введения низкомолекулярного экстракта из эмбриональных тканей птиц, являющегося источником широкого ряда биологически активных молекулярных компонентов – аминокислот, жирных кислот, ростовых факторов, цитокинов [Кузнецова и др., 2014].

Целью нашей работы было проанализировать морфо-функциональные особенности костной ткани и костного мозга мышей при введении экстракта из эмбрионов кур перед внешним общим однократным воздействием γ -излучения.

Объекты и методы исследования

Объектом исследования были самки белых беспородных мышей, массой 22 ± 1.0 г, 2-месячного возраста общей численностью 66 животных. В работе был использован экстракт из эмбриональных тканей кур, полученный по методике, разработанной в Харьковской зооветеринарной академии [Жегунов и др., 2013]. Общее однократное внешнее облучение мышей осуществлялось на установке РУМ-17 в дозе 5 Гр на протяжении 12 минут 30 секунд при кожно-фокусном расстоянии 40 см, силе тока 10 мА, напряжении в трубке 180 кВ, фильтр 0.5Cu + 1Al на базе ГУ «Институт медицинской радиологии им. С.П. Григорьева НАМН Украины». Исследование костного мозга бедренной кости проводили через 7 и 14 суток после радиационного воздействия. Число животных в каждой группе составляло 22, половина из которых была выведена из эксперимента на 7-е сутки, вторая половина – на 14-е сутки опыта. Группы животных: I группа – интактные животные; II группа – животные, которые были подвергнуты действию γ -излучения, выведенные из эксперимента аналогичным образом; III группа – животные, которым вводили препарат в дозе 0.1 мг/кг пятикратно через день и по окончании введения облучили. Забор материала осуществлялся в минимальные сроки после выведения опытных и контрольных животных из эксперимента под эфирным наркозом. Фиксация материала проводилась в простом фиксаторе – забуференном формалине (10% р-р формальдегида). После фиксации препараты отмывали и подвергали постепенному обезвоживанию в серии спиртов возрастающей крепости в течение 1 суток. Далее следовала обработка смесью абсолютного спирта с хлороформом в соотношении 1:1, затем ксилолом и заливка расплавленным насыщенным раствором парафина в хлороформе, далее термостатирование при 37°C в течении 1 суток. Дальнейшая заливка проводилась в термостате при температуре 54–56°C в трех порциях парафина. Завершающая заливка осуществлялась в парафин с добавлением воска с последующим получением парафиновых блоков. Срезы с парафиновых блоков, толщиной 5–10 мкм, получали, используя микротом. Окрашивание срезов после обработки ксилолом проводили раствором гематоксилина и эозина с последующим обезвоживанием и заключением среза в синтетическую среду на основе полистирола (25 г бесцветного полистирола, 5 мл дибутилфталата, с доведением ксилолом до 100 мл объёма). Гистологический анализ проводили с использованием светового микроскопа Primo Star с оптикой Carl Zeiss, объектив план-ахроматической коррекции Plan-Achromat: $40 \times / 0.65$, окуляр $10 \times$ (eyepieces $10 \times / 18$ Bf.foc). Анализировали по 3 среза от каждого животного из всех опытных и контрольной групп. Отдельно подсчитывали абсолютное число ядросодержащих клеток (кариоцитов) костного мозга. Источником костного мозга служили бедренные кости. Суспензию костномозговых клеток готовили механическим способом в среде, для чего суспензию пропускали через шприц с последовательно убывающими иглами, фильтровали через 4-хслойный капроновый фильтр. Подсчитывали число ядросодержащих клеток в суспензии костного мозга, вымытого из бедренной кости в камере Горяева. Полученные данные представляли в виде простой средней арифметической со средним линейным отклонением. При проведении статистического анализа применялся критерий Стьюдента. Различия в средних арифметических считали статистически значимыми при уровне значимо-

сти α – 5%. Работа с животными проводили согласно положениям декларации по гуманному обращению с лабораторными животными, используемыми в экспериментальных исследованиях [European Convention ..., 1986].

Результаты и их обсуждение

При микроскопическом исследовании препаратов бедренной кости intactных мышей, установлено, что основной объем метафизарной части кости представлен губчатой тканью. Снаружи располагается компактная кость. Кортикальное вещество, образующее диафиз кости, состоит из костных пластинок. Наружный слой надкостницы образован плотной соединительной тканью, внутренний её слой состоит преимущественно из остеогенных камбиальных клеток, преостеобластов и остеобластов различной степени дифференцировки. Слой остеонов четко определяется между наружной и внутренней костными пластинками, в центре которых находятся каналы остеонов с проходящими в них кровеносными сосудами. В костных пластинках четко дифференцируются лакуны, внутри которых содержатся остециты (рис. 1).

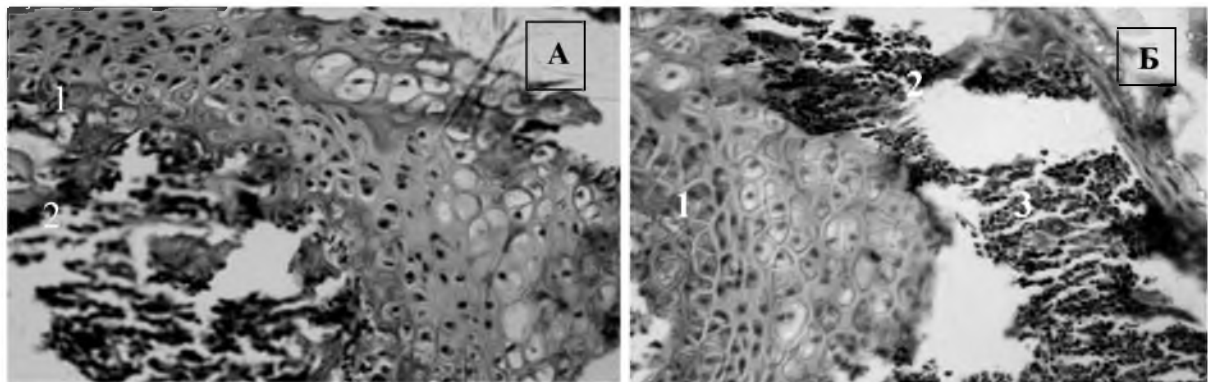


Рис. 1. Бедренная кость intactного животного: А – костные трабекулы (1), костномозговая полость (2); Б – костная ткань (1), костномозговой канал (2), гемопоэтическая ткань (3) (окраска: гематоксилин и эозин $\times 400$)

Fig. 1. Femur intact animal: А – the bone-trabeculae (1), bone marrow cavity (2); Б – the bone tissue (1), medullary canal (2), hematopoietic tissue (3) (colouring: hematoxylin and eosin $\times 400$)

От компактной части трубчатой кости в костномозговую полость вдаются костные трабекулы. Нежная строма кости образована ретикулярной тканью, жировыми клетками и сосудами. Паренхиму составляют гемопоэтические островки, состоящие из гемопоэтических клеток на различных стадиях дифференцировки (рис. 1). В результате подсчета абсолютного числа кариоцитов костного мозга у intactных животных установлено значение $16.9 \pm 1.28 \times 10^9/\text{л}$ (рис. 2).

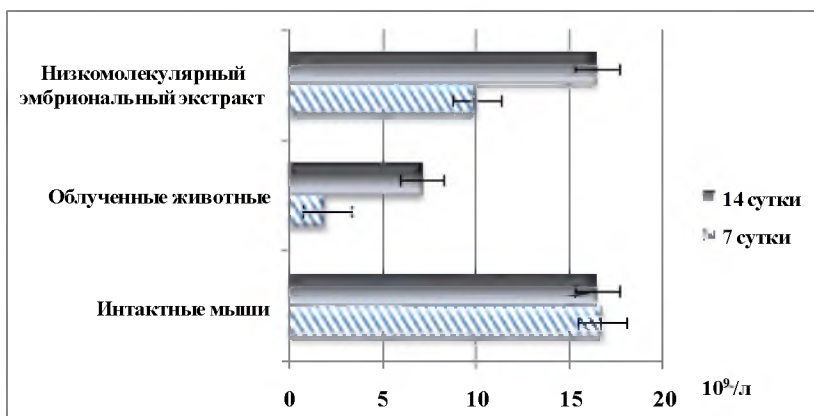


Рис. 2. Динамика содержания абсолютного числа ядродержащих клеток в костном мозге бедренной кости мышей при профилактическом применении экстракта из эмбриональных тканей птиц у облученных животных
Fig. 2. Dynamics of the absolute number of nucleated cells in the bone marrow of the femur of mice in prophylactic use in irradiated animals

В группе животных, подвергнутых тотальному облучению на 7-е сутки эксперимента, на срезе бедренной кости выявлены выраженные признаки дистрофии стромы и паренхимы костного мозга и уплотнение структуры костной ткани (рис. 3).

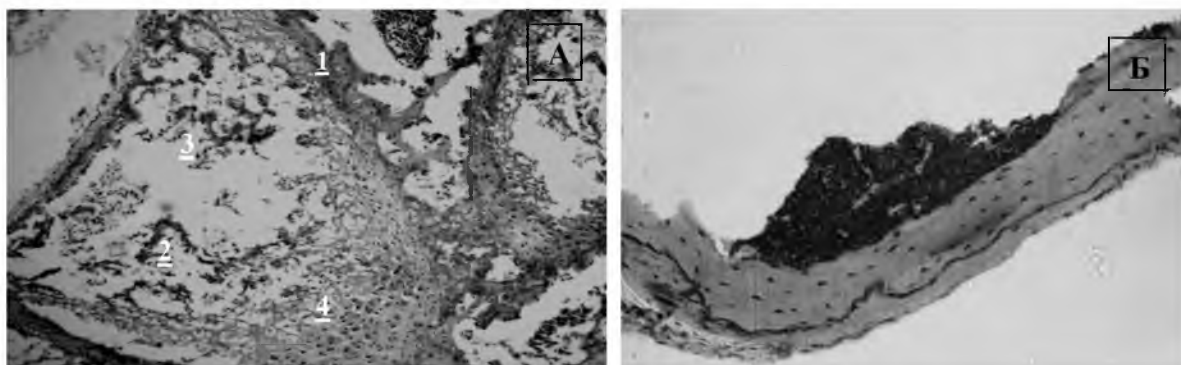


Рис. 3. Срез бедренной кости мыши после однократного тотального облучения (7-е сутки). А – строма и паренхима костного мозга: дистрофически измененные костные трабекулы (1); костномозговая полость (2); гипоплазия гемопоэтической ткани (3); дистрофически и некротически измененные остеоциты (4). Б – уплотненная структура костной ткани (окраска: гематоксилин и эозин $\times 400$)

Fig. 3. Slice of thighbone after a single whole-body irradiation (day 7). А – the stroma and parenchyma of the bone tissue: degenerative changes of the bone trabeculae (1); the medullary cavity (2); hypoplasia of the hematopoietic tissue (3); degenerative and necrotic changes osteocytes (4). Б – the compact structure of bone tissue (colouring: hematoxylin and eosin $\times 400$)

В некоторых полях зрения отмечено выраженное истончение трабекул губчатой кости в метафизарной части. В наружном слое костных пластинок определялись коллагеновые волокна, идущие параллельно друг другу в разных направлениях. Также на 7-е сутки после тотального облучения животных было отмечено истончение и резорбция костной ткани, но особенно явными были структурные перестройки стромального микроокружения бедренной кости, которые выражались в гипоплазии гемопоэтической ткани. Так, абсолютное число кариоцитов костного мозга у данной группы животных – $2.1 \pm 0.19 \times 10^9/\text{л}$, что достоверно меньше, ($p \leq 0.01$), чем у интактных мышей, и составило 12% от нормы (рис. 2). В костномозговой полости кости выявлялись углубления и лакуны, каналы остеоннов сужены по сравнению с образцами, взятыми у интактных мышей (рис. 4).

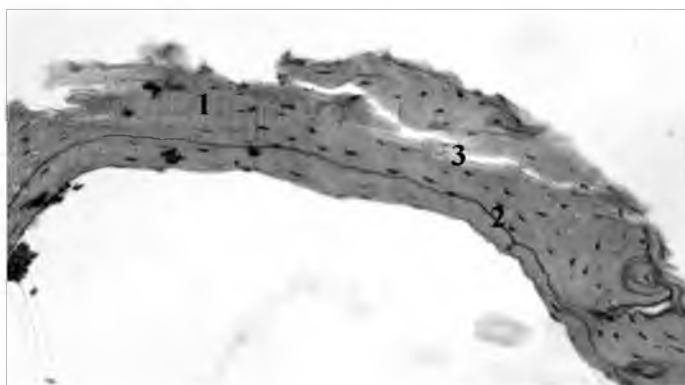


Рис. 4. Костная ткань после тотального облучения (7-е сутки). Дистрофические изменения костной ткани: измененные остеоциты (1); склероз сосудов (2); единичные остеобласты (3) (окраска: гематоксилин и эозин $\times 400$)

Fig. 4. Bone tissue after total body irradiation (day 7). Degenerative changes in bone tissue: osteocytes changed (1); vascular sclerosis (2); individual osteoblasts (3) (colouring: hematoxylin and eosin $\times 400$)

Известно, что остеобласты регулируют процессы остеогенеза и гемопоэза. В частности остеобласты секретируют цитокины, стимулирующие пролиферацию стволовых кроветворных клеток (СКК). В то же время они продуцируют в межклеточный матрикс белок остепонтин, являющийся обратным регулятором содержания СКК [Stier et al., 2005], т. е. незначительное количество остеобластов в костной ткани животных, подвергнутых облучению, является маркером вяло текущих регенераторных процессов. Об этом свидетельствуют хаотичные, очаговые скопления гемопоэтических клеток в строма бедренной кости, а также увеличение количества адипоцитов, которые в отличие от остеобластов являются ингибиторами гемопоэза.

После предварительного введения низкомолекулярного препарата из эмбриональных тканей птиц экспериментальным животным на 7-е сутки после облучения наблюдалась совершенно иная морфологическая картина костной ткани и костного мозга. Костные трабекулы губчатой кости, вдающиеся в костномозговую полость, были значительно шире по сравнению с группой контроля. В костной ткани животных данной группы выявлено большое количество

остеобластов, что свидетельствует об инициации остеогенеза и процессов кроветворения в костной ткани облученных животных (рис. 5).

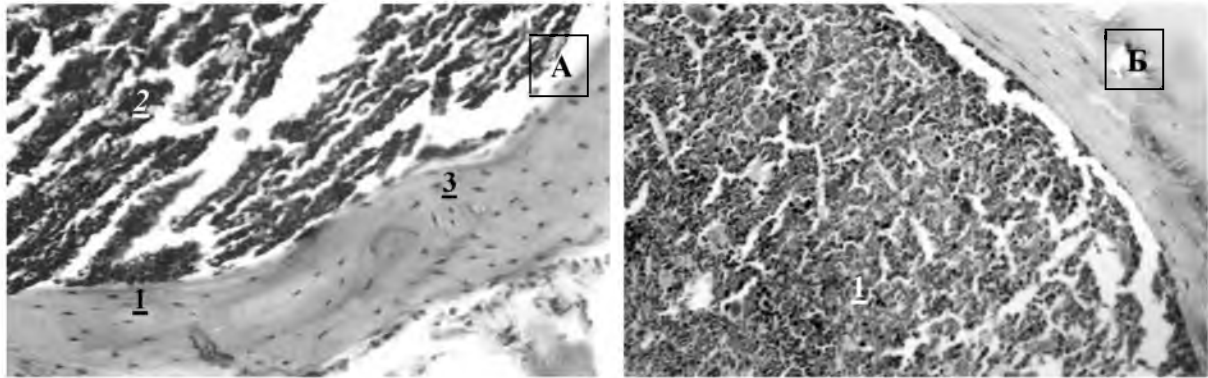


Рис. 5. Срез бедренной кости мышей (7-е сутки эксперимента), после тотального облучения на фоне предварительного введения препарата из эмбриональных тканей птиц. А: Костные трабекулы губчатой кости, вдающиеся в костномозговую полость, широкие, неуплотненные (1); гиперплазия гемопоэтической ткани (2); остециты с ядрами нормальной структуры (3).

Б: Скопление гемопоэтических клеток (1), активный гемопоэз и умеренное количество макрофагов в полости бедренной кости (окраска: гематоксилин и эозин $\times 400$)

Fig. 5. Slice of thighbone mice (day 7 of the experiment) after total body irradiation prior to injection background of avian embryonic tissues. A: the bone trabeculae of spongy bone jutting out into the medullary cavity wide: unconsolidated (1); hematopoietic tissue hyperplasia (2); osteocytes with the nuclei of normal structure (3). B: An area of hematopoietic cells (1), the active hematopoiesis and moderate number of macrophages in the cavity of the femur (colouring: hematoxylin and eosin $\times 400$)

Помимо изменений в костной ткани, были отмечены свидетельства активизации гемопоэза в матриксе бедренной кости, количество бластных форм значительно преобладало над более дифференцированными клетками костного мозга, число кариоцитов составило $10.3 \pm 0.2 \times 10^9/\text{л}$, что в 5 раз превышало значения у облученных мышей, не получавших препарат на 7 сутки исследования, и составляло 59.5% нормы (см. рис. 2, 5).

На 14-е сутки после облучения в контрольной группе животных нормализации морфологической структуры бедренной кости не наблюдалось. В частности отмечено утолщение компактного вещества диафиза, что происходило вследствие увеличения количества остеонов, причем каналы остеонов имели больший диаметр. Отмечена деформация ядер в остеоцитах костной ткани и в целом на 14-е сутки после тотального облучения паренхима кости контрольной группы животных была с выраженными дистрофическими изменениями (рис. 6). Абсолютное число кариоцитов на данные сутки исследования – $7.2 \pm 0.31 \times 10^9/\text{л}$, что составило 42.3 % от нормы, (рис. 2).

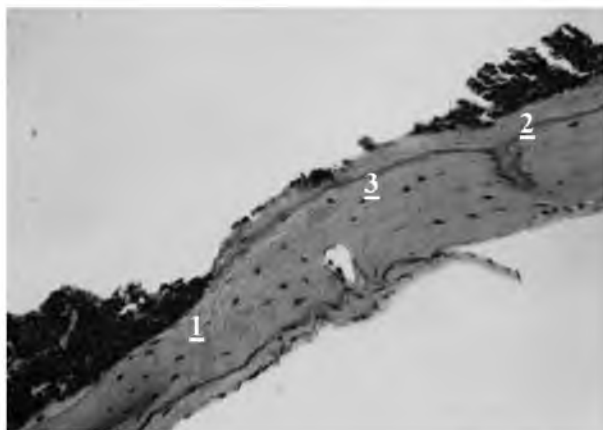


Рис. 6. Костная ткань после тотального облучения (14-е сутки). Истонченная, дистрофически измененная костная ткань (1); остециты (2); сосуды (3)

(окраска: гематоксилин и эозин $\times 400$)

Fig. 6. Bone tissue after total body irradiation (day 14). Thinning, dystrophic changes of the bone (1); osteocytes (2); vessels (3) (colouring: hematoxylin and eosin $\times 400$)

Также в данной группе животных на 14-е сутки эксперимента на фоне снижения активности гемопоэза отмечено уменьшение количества ретикулярной ткани, которая в норме обнаруживалась в виде тонких оксифильных прослоек. Вместе с тем отмечено сравнительно больше клеток эритроцитарного ряда, которые идентифицировались по гиперхромной окраске гемо-

поэтических клеток. В костной ткани облученных мышей было выявлено разрастание жировой ткани.

На 14-е сутки после облучения в костной ткани животных, которым перед облучением вводили препарат из эмбриональных тканей птиц, по сравнению с контролем наблюдались прогрессивные изменения. Углублений и выемок в компактной кости диафиза со стороны костномозговой полости не обнаружено. В наружном слое общих костных пластинок определялись коллагеновые волокна, идущие параллельно друг другу в разных направлениях (рис. 7). В целом в некоторых полях зрения костная ткань не отличалась от нормы. В костном матриксе активизации гемопоэза, такой как на 7-е сутки эксперимента, не наблюдалось, абсолютное число кариоцитов составило $16.7 \pm 1.6 \times 10^9/\text{л}$, что было сопоставимо со значениями в норме и достоверно превышало ($p \leq 0.05$) данные, полученные на 14 сутки у облученных животных без применения эмбрионального экстракта. В поле зрения выявлялись единичные адипоциты. В целом структура костной ткани данной группы животных не отличалась от интакта (рис. 7).

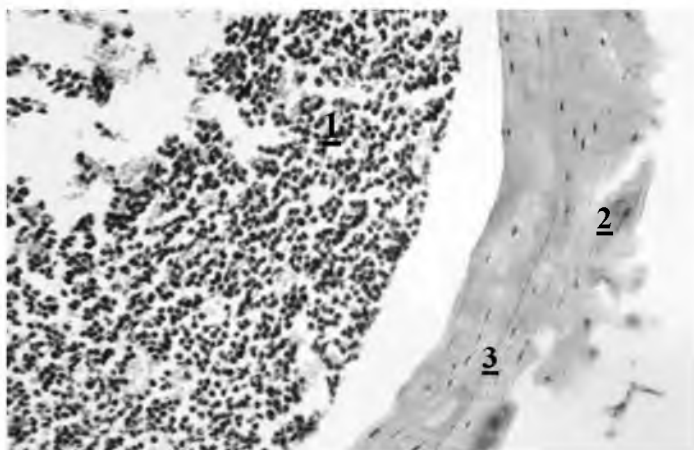


Рис. 7. Костная ткань мышей (14-е сутки эксперимента), после тотального облучения на фоне предварительного введения препарата из эмбриональных тканей птиц: нормализация гемопоэза (1); нормальная структура костной ткани (2); остеобласты (3) (окраска: гематоксилин и эозин $\times 400$)
 Fig. 7. Bone mice (day 14 of the experiment) after total body irradiation prior to injection background of avian embryonic tissues: normalization of hematopoiesis (1); normal bone structure (2); osteoblasts (3) (colouring: hematoxylin and eosin $\times 400$)

Таким образом, проведенные гистологические исследования костной ткани и костного мозга бедренной кости животных после тотального облучения свидетельствуют о выраженных нарушениях паренхиматозно-стромальных взаимоотношений в кроветворной ткани губчатого вещества бедренной кости. В свою очередь известно, что взаимоотношения строма – паренхи́ма в системе гемолимфопоэза являются базисом для развития и созревания миелоидных и лимфоидных клеток в норме. Доказано, что стромальные дефекты могут играть ключевую роль в развитии гемобластозов, включая заболевания, обусловленные малигнизацией гемолимфопоэза [Ghia et al., 2005; Scadden, 2007; Krause et al., 2013].

Заключение

Предварительное введение мышам низкомолекулярного препарата из эмбриональных тканей птиц перед воздействием на них общего внешнего однократного γ -излучения в дозе 5 Гр предотвращало нарушение остеогенеза и гемопоэза в бедренной кости. На 7-е сутки после воздействия γ -излучения в указанном режиме в костной ткани животных выявлено большое количество остеобластов, свидетельствующее об инициации остеогенеза и процессов кроветворения в костном мозге облученных животных, при чем на 14-е сутки после радиационного воздействия на фоне применения препарата морфологическая картина в целом была трудно отличима от нормы. При подсчете абсолютного числа ядросодержащих клеток в костном мозге бедренной кости было обнаружено его значительное снижение на 7 и 14-е сутки после облучения в сравнении с интактными животными. При профилактическом применении низкомолекулярного эмбрионального экстракта облученным животным ядросодержащие клетки костного мозга не пострадали в количественном отношении в той же мере как клетки костного мозга без применения экстракта, и на 14-е сутки их число достигало нормальных значений. Приведенная гистоморфологическая картина костной ткани и костного мозга бедренной кости мышей, сформировавшаяся на фоне профилактического применения препарата из эмбриональных тканей птиц перед воздействием внешнего тотального однократного γ -излучения в сублетальной дозе 5 Гр на мышей, свидетельствует о перспективности применения радиопротекторных свойств данной субстанции.



Список литературы References

1. Жегунов Г.Ф., Кузнецова В.Г., Тимохина Ю.О., Мершинець Ю.О., Погоріла М.С. 2013. Отримання екстракту з ембріонів курей. Патент України №85646. Бюл. №22.
Gegunov G.F., Kuznetsova V.G., Timohina Yu.O., Mershinets Yu.O., Pogorelaja M.S. 2013. Preparations of the Extract of Chick Embryos. Patent UKR. №85646. Bull. 22. (in Ukrainian)
2. Кузнецова В.Г., Жегунов Г.Ф., Погорелая М.С. 2014. Исследование содержания аминокислот и жирных кислот в экстракте из эмбрионов кур. Вісник проблем біології і медицини, 4 (3): 60–65.
Kuznetsova V.G., Gegunov G.F., Pogorelaja M.S. 2014. Contents of amino acids and fatty acids in extracts from chick embryos. *Visnik problem biologii i medicini*, 4 (3): 60–65. (in Russian)
3. Шибкова Д.З., Аклев А.В. 2006. Адаптационно-компенсаторные реакции системы кроветворения при хроническом радиационном воздействии. Челябинск, Изд-во ЧГПУ, 328.
Shibkova D.Z., Akleyev A.V. 2006. *Adaptacionno-kompensatornyie reaktzii sistemyi krovetvoreniya pri chronicheskom radiatsionnom vozdeystvii* [Adaptive-compensatory reactions of hematopoietic system in chronic radiation exposure]. Chelyabinsk, Izd-vo ChGPU, 328. (in Russian).
4. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. 1986. Strasburg, Council Treaty Series, 123.
5. Ghia P., Circosta P., Scielzo C. 2005. Differential effects on CLL cell survival exerted by different microenvironmental elements. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 294: 135–145.
6. Krause D., Scadden D., Preffer L. 2013. The Hematopoietic Stem Cell Niche-Home for Friend and Foe? *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 84 (1): 7–20.
7. Scadden D.T. 2007. The stem cell niche in health and leukemic disease. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 20 (1): 19–27.
8. Stier S., Ko Y., Forkert R. et al. 2005. Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. *Journal of Experimental Medicine*, 201: 1781–1791.
9. Tokoyoda K., Egawa T., Sugiyama T. 2004. Cellular niches controlling B-lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity*, 20: 707–718.
10. Mendez-Ferrer S., Michurina T.V., Ferraro F. et al. 2010. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*, 466: 829–834.
11. Nagasawa T., Sugiyama T. 2012. Bone Marrow Niches for Hematopoietic Stem Cells and Immune Cells. *Inflammation & Allergy*, 11: 201–206.