

РАЗДЕЛ 1 – ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ PART 1 – RESEARCH ARTICLES

ВЛИЯНИЕ ГЕТЕРОТРАНСПЛАНТАЦИИ КОСТНОГО МОЗГА НА ПРОДУКЦИЮ НЕЙРОМЕДИАТОРОВ ЕГО НЕЙРОАМИН-ПРОДУЦИРУЮЩИМИ КЛЕТКАМИ

Воробьева О.В., Любовева Л.А.

Чувашский государственный университет им. И.Н.Ульянова, Чебоксары, Россия, e-mail: olavorobeva@mail.ru

THE INFLUENCE OF THE BONE MARROW XENOTRANSPLANTATION ON PRODUCING OF MEDIATORS BY ITS NEUROAMINE-PRODUCING CELLS

Vorob'eva OV, Lubovtseva LA

Chuvash State University, Cheboksary, Russia, e-mail: olavorobeva@mail.ru

Для цитирования:

Воробьева О.В., Любовева Л.А. Влияние гетеротрансплантации костного мозга на продукцию нейромедиаторов его нейроамин-продуцирующими клетками// Морфологические ведомости.- 2018.- Том 26.- № 4.- С. 7-10. [https://doi.org/10.20340/mv-mn.18\(26\).04.7-10](https://doi.org/10.20340/mv-mn.18(26).04.7-10)

For the citation:

Vorob'eva OV, Lubovtseva LA. The influence of the bone marrow xenotransplantation on producing of mediators by its neuroamine-producing cells. Morfologicheskie Vedomosti – Morphological Newsletter. 2018 Dec 30;26(4):7-10. [https://doi.org/10.20340/mv-mn.18\(26\).04.7-10](https://doi.org/10.20340/mv-mn.18(26).04.7-10)

Резюме: Проведен анализ количественных показателей нейроамин-продуцирующих клеток и содержания в них нейромедиаторов в них, изучена корреляция показателей их продукции после гетеротрансплантации костного мозга. Опыты проводились на белых лабораторных мышах, которым в хвостовую вену вводили клеточную суспензию, полученную от домашней кошки. На ранних сроках эксперимента увеличивается число нейроамин-продуцирующих клеток, с повышением содержания в них нейромедиаторов. В последующие сроки эксперимента происходит снижение их числа и резкое уменьшение в них всех нейромедиаторов (катехоламинов, серотонина, гистамина). Отмечается образование липоцитов в пересаженной ткани. Изменяются также корреляционные соотношения между показателями содержания нейромедиаторами в нейроамин-продуцирующих клетках костного мозга. Таким образом, ксенотрансплантация костного мозга приводит к снижению числа и продукции нейромедиаторов нейроамин-продуцирующими клетками в течение двух суток.

Ключевые слова: костный мозг, ксенотрансплантация, нейроамин-продуцирующие клетки, тучные клетки, катехоламины

Summary: The quantitative indicators of neuroamine-producing cells and the content of neuromediators in them were analyzed, the correlation of indicators of their production after bone marrow xenotransplantation was studied. The experiments were conducted on white laboratory mice, which were injected with a cell suspension obtained from a domestic cats into the tail vein. In the early stages of the experiment, the number of neuroamine-producing cells increases, with an increase in the content of neurotransmitters in them. In the subsequent periods of the experiment, their number decreases and the production of all neuromediators (catecholamines, serotonin, histamine) sharply decrease. The formation of lipocytes in the transplanted tissue is showed. Correlations between the levels of neuromediators in neuroamine-producing bone marrow cells also change. Thus, bone marrow xenotransplantation leads to a decrease in the number and production of neuromediators by neuroamine-producing cells within two days.

Key words: bone marrow, xenotransplantation, neuroamine-producing cells, mast cells, catecholamines

Введение. В последние десятилетия наблюдается тенденция к росту числа опухолевых процессов среди лиц молодого возраста. Участились случаи поражения костного мозга, поскольку клетки костного мозга обладают повышенной чувствительностью к различным воздействиям. Единственным способом оказания специализированной помощи таким пациентам является трансплантация костного мозга. Однако, в организме реципиента при введении чужеродного костного мозга развивается реакция «трансплантат против хозяина», вследствие этого гетеротрансплантация костного мозга не проводится. В настоящее время считается доказанным, что в регуляции костномозгового кроветворения приоритетное место принадлежит нейромедиаторам, синтезируемым гранулярными люминесцирующими клетками (далее – ГЛК) и тучными клетками (далее – ТК) [1-3]. На своей поверхности нейроамин-содержащие клетки (как ГЛК, так и ТК) имеют разнообразные рецепторы. В ГЛК и ТК синтезируются нейромедиаторы катехоламины, серотонин, гистамин при помощи которых эти клетки участвуют в регуляции дифференцировки и пролиферации большинства клеток костного мозга [1, 3-6].

Цель исследования – изучение числа гранулярных люминесцирующих и тучных клеток, продукции в них нейромедиаторов и корреляционный анализ их содержания после гетеротрансплантации.

Материалы и методы исследования. Опыты проводились на 60 белых мышах-самцах, массой 50-60 грамм. Животные были распределены на 3 группы: 1-я – интактные животные, без введения костного мозга (далее – КМ, n=20); 2-я – контрольные животные (n=20), которым вводили 0,85% физиологический раствор в дозе 1 мл на кг массы тела; 3-я – опытная группа животных, которым вводили клеточную суспензию костного мозга кошки (n=20). Из эпифиза бедренной кости кошки путем аспирации извлекали 1 мл костного мозга, разводили в 2 мл 0,85% физиологического раствора, затем полученную суспензию вводили в хвостовую вену мышей. Криостатные срезы, полученные из эпифизов бедренной кости мышей, исследовали люминесцентно-гистохимическим методом Фалька-Хилларпа для определения катехоламинов (далее – КА) и серотонина (далее – СТ) [7]. Метод основан на реакции конденсации КА и СТ с формальдегидом, которые в результате дегидратации превращаются в интенсивно люминесцирующие вещества. С помощью люминесцентно-гистохимического метода Кросса с соавт. определяли гистамин [8]. Метод основан на реакции паров ортофталевого альдегида с гистамином, в ходе которой также образуется флуоресцирующее соединение. Метод спектро-флуориметрии

применялся для определения содержания СТ, КА и гистамина в гранулярных люминесцирующих и тучных клетках КМ в условных единицах свечения (у.е.).

Корреляционный анализ использовался для выявления связей между содержанием нейромедиаторов парах КА-СТ, СТ-гистамин, КА-гистамин в ГЛУ и ТК КМ после гетеротрансплантации. Вычисление серотонинового индекса соотношения СТ/КА проводилось для определения ведущей роли одного из нейромедиаторов (КА или СТ). При значении серотонинового индекса (далее – Is) больше единицы, можно предполагать преобладание в клетке содержания СТ. При значении Is меньше единицы в клетке преобладает содержание КА [9]. Статистическую обработку проводили с использованием пакета программ «Statistica 6.0». В работе приводятся следующие показатели: М – средняя арифметическая величина; σ – ошибка средней арифметической величины. Статистическую достоверность определяли критерием Стьюдента (t).

Результаты исследования и обсуждение. У мышей 2-й группы до 30 мин после введения физиологического раствора в хвостовую вену наблюдались изменения в содержании нейромедиаторов; через 30 мин показатели уравнивались с интактными мышами, в связи с этим данные учитывали у опытных животных начиная с 40-й минуты. При люминесцентно-гистохимическом исследовании в мазках костного мозга у интактных мышей определяются яркие ГЛК диаметром от 13 до 22 мкм, имеющие амёбовидную форму, с гранулами разного размера и цвета. Чаще всего ГЛК расположены около островков размножения по ходу нервных волокон. ТК определяются как мелко-гранулярные округлые клетки диаметром от 9 до 18 мкм с зелеными люминесцирующими гранулами. ТК располагаются около островков размножения одиночно либо в составе групп клеток в которые входят ГЛК, ТК, ретикулярные клетки, макрофаги, липоциты, образующих в КМ комплексы. Рядом с ними располагаются группы вновь образующихся клеток эритроидного и нейтрофильного рядов.

Таблица 1
Показатели содержания серотонина в клетках костного мозга
в условных единицах свечения (М±σ)

Клетки	Сроки после трансплантации костного мозга					
	Контрольная группа	40 мин	60 мин	4 часа	1 сутки	2 суток
ГЛК	14,1±0,8	40,1±3,8	32,2±0,8	3,2±0,5	17,5±1,5	-
ТК	21,3±0,9	11,5±2,7	44,2±3,7	8,3±4,7	3,4±0,3	-

У мышей 3-й опытной группы через 40 мин после гетеротрансплантации КМ, отмечается тенденция к уменьшению числа ГЛК, однако содержание КА и СТ в них повышено (табл. 1). Число ТК в 1,5 раза превышает показатели интактных животных. Отмечается увеличение содержания КА до 21,7±0,6 у.е. (у интактных – 18,6±0,6 у.е.), но содержание СТ в

них уменьшается (табл. 1). При изучении содержания гистамина выявлено его снижение в ГЛК до 15,7±0,5 и в ТК до 27,8±0,5 у.е. по сравнению с интактными (31,6±0,7 и 28,1±0,6 у.е., соответственно). Некоторые ТК были дегранулированы, что приводит к усилению люминесценции межклеточного пространства. Усиленно люминесцируют эритроциты, что указывает на наличие гистамина в них, эта особенность не выявляется у мышей 1-й группы. Это связано с тем, что эритроциты адсорбируют межклеточный гистамин.

Таблица 2
Корреляционные связи между содержанием нейромедиаторов в нейромин-продуцирующих клетках костного мозга после гетеротрансплантации

Клетки	Корреляционные пары	Интактные животные	40 мин	4 часа	1 сутки
ГЛК	КТ/СТ	-0,9	-0,7	-0,06	0,3
	СТ/гистамин	0,4	0,9*	0,09	-0,2
	КА/гистамин	-0,5	0,8*	0,6	0,6
	Is	0,9	0,9	0,06	5,8
ТК	КА/СТ	0,9	0,5	-0,3	-0,5
	СТ/гистамин	0,8	-0,7	0,4	0,98*
	КА/гистамин	-0,7	-0,7	0,7	0,5
	Is	1,09	2	0,3	0,5

Примечание: * - статистическая значимость коэффициента корреляции, $p < 0,05$

Через 60 мин после гетеротрансплантации КМ в ГЛК и ТК отмечено еще большее повышение КА и СТ. Содержание гистамина сохраняется уменьшенным, как в ГЛК, так и в ТК. Однако, некоторые гемопозитические клетки имеют высокое содержание гистамина (табл. 1). Через 4 часа отмечается дальнейшее увеличение содержания КА до 53,1±0,7 в ГЛК и до 28,6±0,7 у.е. в ТК. Однако, содержание СТ в них начинает резко уменьшаться. Число ГЛК и

ТК в костном мозге через 4 часа после гетеротрансплантации уменьшается. Отмечаются разнонаправленные показатели содержания гистамина в нейромин-продуцирующих клетках – снижение в ГЛК и резкое его повышение в ТК. Через 1 сутки некоторые ГЛК определяются распавшимися, образующими скопление люминесцирующих гранул в срезах костного мозга. В сохранных ГЛК отмечается понижение содержания КА до 5,1±0,5 у.е., в ТК до 7,3±0,5 у.е. Аналогичное снижение гистамина выявлено в ГЛК до 3,2±0,5 у.е. и в ТК до 7,4±0,2 у.е. Однако, содержание СТ к этому сроку сохраняется повышенным (табл. 1). В отличие от интактных мышей, большинство ТК костного мозга мышей экспериментальных групп имеют меньшие размеры, возможно, это компактные формы клеток с низким содержанием КА и СТ. В пересаженном костном мозге увеличивается число липоцитов от 7 до 8 (рис. 1), у интактных их число составляет от 1 до 2 клеток. Более того, около них

определяются мелкие, компактные, тучные клетки. Через 2-е суток сохранные ГЛК и ТК в костном мозге не определяются, выявляются лишь единичные люминесцирующие гранулы, отмечается диффузное свечение в межклеточном пространстве.

При исследовании корреляционных связей в парах содержания нейромедиаторов установлено, что через 40 минут после гетеротрансплантации КМ в ГЛК в парах содержания СТ-гистамин и КА-гистамин определяются сильные положительные статистически значимые связи (до +0,9), что указывает на одновременное влияние этих нейромедиаторов на гемопозитические клетки. В ТК определяются отрицательные корреляционные связи содержания в парах СТ-гистамин и КА-гистамин ($p < 0,05$), что вероятно указывает на выделение в межклеточное пространство только одного нейромедиатора в результате конкурентного вытеснения (табл. 2). Ко 2-м суткам эксперимента все корреляционные связи между содержанием нейромедиаторов в клетках нарушаются и полностью исчезают, что указывает на отсутствие их влияния на клетки костномозгового кроветворения [4, 10].

Показатель серотонинового индекса до 40 мин эксперимента увеличивается до двух единиц в ТК, а в дальнейшем становится меньше единицы. По условиям метода снижение серотонинового индекса менее единицы указывает на то, что нейромедиаторный механизм регулирования пролиферации гемопозитических клеток с помощью ГЛК и ТК нарушается [4, 10-12].

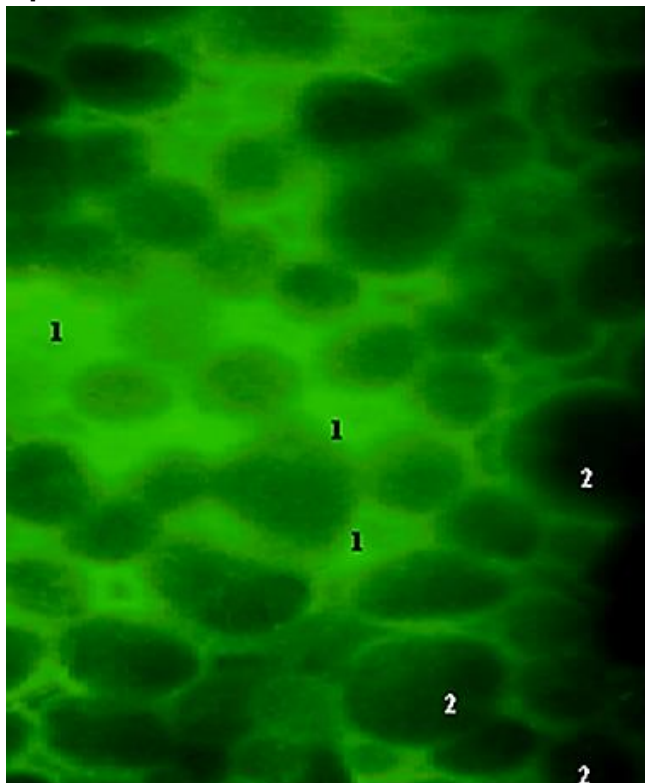


Рис. 1. Срез костного мозга через 1 сутки после гетеротрансплантации. Обозначения: 1 - диффузная люминесценция в межклеточном пространстве; 2 - липоциты. Окр.: методом Кросса. Ув.: x1000.

Закключение. Таким образом, установлено, что в условиях эксперимента после ксенотрансплантации костного мозга в течение 40 минут происходит повышение содержания нейромедиаторов в его ГЛК и ТК, а также в нем увеличивается число нейроамин-продуцирующих клеток. В последующие сроки происходит дегрануляция ТК с тотальным распадом, а также выброс нейромедиаторов из гранул ГЛК, вследствие этого отмечается диффузная люминесценция межклеточного пространства, увеличивается число липоцитов. Как известно, белая жировая ткань адсорбирует на себе катехоламины, серотонин, гистамин [4]. Поскольку нейроамин участвуют в делении и дифференцировке клеток, липоциты в ответ на введенный чужеродный антиген адаптационно накапливают нейромедиаторы, тем самым защищая организм от размножения чужеродных клеток. Таким образом гетеротрансплантация костного мозга на ранних сроках эксперимента способствует увеличению нейромедиаторов в его ГЛК и ТК. После 4 часов, начала эксперимента происходит разрушение этих клеток, наблюдается постепенное увеличение числа липоцитов, в них нарушаются корреляционные соотношения содержания нейромедиаторов.

ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Vorob'eva O.V., Lyubovceva L.A. Vozdejstvie geterotransplantacii na nejroaminy v strukturah kostnogo mozga// Morfologicheskie vedomosti.– 2015.- № 4.- S. 54-58.
2. Vorob'eva O.V. Lokalizaciya indolsoderzhashchih veshchestv v strukturah kostnogo mozga posle geteroperesadki// Morfologicheskie vedomosti.- 2017.- T. 25.- № 2.- S. 51-53. doi: 10.20340/mv-mn.17(25).02.09
3. Gur'yanova E.A., Lyubovceva L.A., Lyubovceva E.V., Moskovskij A.V. Mestnaya reguljaciya organov bioaminsoderzhashchimi kletkami// Morfologija.– 2009.– № 4.– S. 41.
4. Karnauhov V.N. Lyuminescentnyj analiz kletok.– Pushchino: Elektronnaya mikroskopiya, 2002.– 131s.
5. Abedi M, Foster BM, Wood KD et al. Haematopoietic stem cells participate in muscle regeneration. Br. J. Haematol. 2007;138:792-801.
6. Boyce JA. The biology of the mast cell. Allergy. and Asthma Proc. 2004;25(1):27-30.
7. Falck B, Hillarp NA, Thieme G, Torp A. Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde. J. Histochem. Cytochem. 1962;10:348-354.
8. Cross SAM, Ewen SWB, Rost EWD. A study of the methods available for the cytochemical inflammatory of histamine by fluorescence induced with o-phthalal-aldehyde or acetaldehyde. J. Histochem. 1971;6:471-476.
9. Platonov A.E. Statisticheskij analiz v medicine i biologii.- M.: Izdatel'stvo RAMN, 2000.– 50s.
10. Lyubovceva L.A., Gordon D.S., Arseeva A.V. Lyuminescentno-gistohimicheskij analiz vliyanija nejromediatorov VNS na struktury kostnogo mozga/ V kn.: Lyuminescentnyj analiz i ego apparaturnoe obespechenie.– Riga: Izd-vo RMA, 1988.- S. 237.
11. Kvetnoj SH.M., Yuzhakov V.V. Melatoninproduciyushchie kletki: reguljaciya mezhkletochnyh vzaimodejstvij/ V kn.: Reaktivnost' i regeneraciya tkanej.– L., 1977.– S. 30.

12. Lyubovtseva L.A., Borisov A.V. Vliyaniye serotoninina na proliferatsiyu kletok kostnogo mozga/ V kn.: Morfologiya i lyuminescentnaya gistohimiya.– Cheboksary: Izd. Chuvash. un-ta, 1983.– S. 124-126.

Авторская справка

Воробьева Ольга Васильевна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры общей и клинической морфологии и судебной медицины, Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова, Чебоксары, Россия; e-mail: olavorobeva@mail.ru

Любовцева Любовь Алексеевна, доктор биологических наук, профессор кафедры общей и клинической морфологии и судебной медицины, Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова, Чебоксары, Россия; e-mail: olavorobeva@mail.ru