

МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОСТНОГО МОЗГА ПРИ АУТОПЕРЕСАДКЕ

ВОРОБЬЕВА О.В., ЛЮБОВЦЕВА Л.А., ЛЮБОВЦЕВА Е.В.

MORPHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF BONE MARROW AUTOGRAFT

VOROBIEVA O.V., LYUBOVITSEVA L.A., LYUBOVITSEVA E.V.

Кафедра общей и клинической морфологии и судебной медицины (зав. кафедрой - профессор Л.А. Любовева) ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н.Ульянова, г. Чебоксары.

С помощью люминесцентно - и иммуногистохимических методов был исследован костный мозг мышей в разные сроки после аутопересадки. Целью исследования явилось изучение сопряжения между нейротрансмиттерными структурно-функциональными единицами костного мозга при аутопересадке. В эксперименте выявлено, что нейроамин осуществляет контроль за размножением, дифференцировкой клеточных структур костного мозга с помощью синтеза биологически активных веществ, выделяемых в межклеточное пространство. Выделяемые вещества влияют на корреляционные связи между нейроaminaми в костном мозге, изменяя внутриклеточную регуляцию. Показано влияние серотонинового индекса на процессы сдерживания размножающихся клеток или процессы усиленного размножения этих клеток. Выявлено регуляторное звено в костном мозге, осуществляющее контроль за размножением клеток.

Ключевые слова: аутотрансплантация костного мозга, катехоламины (КА), серотонин (СТ), гистамин, гранулярные люминесцирующие клетки (ГЛК), тучные клетки (ТК).

Cusingluminescence-andimmunohistochemical methods was investigated bone marrow of mice at various times after autograft. The aim of the research was to study the interface between the neurotransmitter sectors Structural-functional units of bone marrow autograft. The experiment revealed that neyroaminy exercise control over reproduction, differentiation of bone marrow cell structures by means of the synthesis of biologically active substances released into the extracellular space. Secrete substances affect the correlation between neyroaminami in the bone marrow, altering the intracellular regulation. The effect of serotonin on the index containment processes proliferating cells

or enhanced processes of reproduction of these cells. Revealed regulatory link in the bone marrow, exercising control over the reproduction of cells.

Key words: autograft bone marrow, catecholamines (CA), serotonin (ST), histamine, granular luminescent cells (HCA), mast cells (MC).

Введение. В связи с ухудшающейся экологией, увеличением числа техногенных катастроф продолжается и рост онкологических заболеваний, что является актуальной проблемой онкогематологии. Следуя литературным данным [1,2,3], можно предположить, что некоторые онкогематологические заболевания связаны с нарушением обмена биогенных аминов в клетке, приводящим к возникновению патологических сдвигов в функционировании красного костного мозга. В последнее время в патогенезе онкологических заболеваний все большее значение придается морфологическим структурам, участвующим в местной регуляции тканевых процессов, а также биологически активным веществам, которые вырабатываются ими [4, 5].

Таким образом, изучение нейроаминного обмена костного мозга при аутопересадке даст возможность выявить структуры, участвующие во внутриклеточной регуляции функции костного мозга.

Цель исследования - выявление сопряжения между нейротрансмиттерными структурно-функциональными единицами костного мозга при аутопересадке костного мозга во временном аспекте.

Материал и методы исследования. В эксперименте использовались мыши, разделенные на 2 группы: 1 – интактные мыши без введения (n=20); 2 – аутогенная пересадка костного мозга (n=20) - животным этой группы внутривенно вводили суспензию костного мозга, полученную от этой же мыши (аутотрансплантация). 0,1 мл костного мозга, взятый из бедренной кости мыши помещали в 1 мл физиологического раствора и тщательно размешивали. 1 мл суспензии костного мозга вводили в хвостовую вену этой же мыши. Число клеток в 1 мл суспензии было равно $2,1 \cdot 10^8$.

Криостатные срезы костного мозга обрабатывались следующими методами: 1) метод Фалька-Хилларпа в модификации Е.М. Крохиной применялся для избирательного выявления катехоламинов и серотонина [7]; 2) метод Кросса, Эвена, Роста для выявления структур, содержащих гистамин [6]; 3) количественно концентрации катехоламинов, серотонина и гистамина в структурах костного мозга оценивались с помощью микрофлуориметрической насадки к люминесцентному микроскопу ФМЭЛ-6. Для определения серотонина использовался светофильтр № 8 с длиной волны 525 нм, для гистамина – № 7 с длиной волны 515 нм и для катехоламинов – фильтр № 6 с длиной волны 480 нм. Показания снимались с табло усилителя У-5 в условных единицах флуоресценции (у. е.); 4) определение серотонинового индекса (Is) использовалось для понятия особенностей распределения биогенных аминов в костном мозге. Is больше 1 свидетельствует о преобладании в клетке серотонина, а меньше 1 – о преобладании в клетке катехоламинов; 5) миелограмму рассчитывали на 500 клеток после окраски препаратов по Паппенгейму; 6) иммуногистохимический метод использовали для выявления пролиферации и апоптоза клеток, экспрессирующие белок p-53 в костном мозге.

Результаты исследования и их обсуждение. При изучении нейромедиаторного обмена после аутопересадки костного мозга учитывались исходные уровни биогенных аминов у интактных животных. Было выявлено, что через 40 мин в мазках костного мозга происходило увеличение числа гранулярных люминесцирующих клеток до 6 клеток (при норме 3-4), с повышенным содержанием катехоламинов и серотонина. В гранулярных люминесцирующих клетках нейромедиаторы определялись не во всех гранулах. Моноамины диффундировали из гранул, вследствие чего наблюдалось увеличение люминесценции межклеточных пространств.

Кроме того, выявлялось незначительно уменьшенное число тучных клеток, с повышенным содержанием всех аминов в них (табл. 1). Встречались дегранулированные тучные клетки.

Около островков размножения располагались нервные волокна, с рядом расположенными гранулярными люминесцирующими и тучными клетками. Выявлялись 2 вида лимфоцитов: с ярко люминесцирующими и тусклыми ядрами.

У юных и палочкоядерных нейтрофилов начинали слабо люминесцировать ядра. В цитоплазме мегакариоцитов увеличивалось содержание катехоламинов и серотонина. Повышалось число размножающихся бластных форм с увеличением в некоторых из них как катехоламинов, так и серотонина.

В мазках костного мозга опытных мышей наблюдалось диффузное свечение гистамина во всех гемопоэтических клетках костного мозга. Увеличивалось в 2 раза, по сравнению с интактными мышами, число гранулярных люминесцирующих клеток, с ярко - желтыми, разнокалиберными гранулами. Кроме того, большое содержание гистамина выявлялось в цитоплазме базофильных мегакариоцитов.

Отмечалась люминесценция мелких тучных клеток, с ассиметрично расположенными, как бы выпирающими, зелеными ядрами. Содержание гистамина в этих тучных клетках повысилось.

Через 2 часа после аутоотрансплантации костного мозга гранулярные люминесцирующие клетки четко располагались около островков размножения, мегакариоцитов, по ходу нервных волокон. Их число не изменилось по сравнению с 40 минутным сроком, но увеличилось содержание катехоламинов и серотонина в отдельных гранулах. Увеличилось число однопипных слабо люминесцирующих круглых клеток, около которых в виде цепочки располагались гранулярные люминесцирующие и, в меньшем числе, тучные клетки.

Тучные клетки отмечались мелкие, воз-

Таблица 1.
Содержание нейромедиаторов в биоаминосодержащих клетках костного мозга через 40 мин после аутоотрансплантации костного мозга

Название клеток	Содержание нейромедиаторов, усл.ед.					
	Катехоламины		Серотонин		Гистамин	
	Интактные	Ауто-	Интактные	Ауто-	Интактные	Ауто-
Число ГЛК	15,6±0,1	18,1±0,1	14,1±0,1	19,2±0,2*	31,6±0,3	34,6±0,3
Число ТК	19,6±0,2	22,3±0,2	21,3±0,4	23,1±0,4	28,1±0,2	34,3±0,2*

Примечание: * - достоверно, даны среднеарифметические цифры; ± амплитуда колебания содержания веществ, p < 0,05.

Таблица 2.

Внутриорганные корреляционные связи между нейроаминами и серотониновый индекс в гранулярных люминесцирующих и тучных клетках после аутотрансплантации костного мозга

Структуры	Взаимодействия	Сроки после аутотрансплантации		
		Интактные	Через 40 мин	Через 2 часа
ГЛК	КА/СТ	-0,9	0,9	-0,3
	СТ/гистамин	0,4	0,6	0,8
	КА/гистамин	-0,5	0,53	0,4
	Серотониновый индекс	0,9	1,06	1,2
ТК	КА/СТ	0,9	0,97	0,7
	СТ/гистамин	0,8	0,7	0,9
	КА/гистамин	-0,7	0,65	0,5
	Серотониновый индекс	1,09	1,04	0,8

Примечание: красным цветом обозначены сильные положительные связи, синим – сильные отрицательные.

можно, что молодые, с меньшим содержанием катехоламинов и серотонина, по сравнению с интактными мышами.

Содержание гистамина увеличилось в основных биоаминсодержащих клетках, но наблюдалась усиленная дегрануляция тучных клеток, и раздробленность свечения некоторых гранулярных люминесцирующих клеток.

Выявлялись комплексы клеток, состоящие из гранулярных люминесцирующих, макрофагов, ретикулярных клеток и липоцитов, образующие тесный контакт между собой в центре кроветворных островков. Особенно часто такие контакты выявлялись в центре размножения и дифференцировки клеток эритроидного ростка.

При исследовании внутриорганных корреляционных связей через 40 мин после аутопересадки между нейроаминами в гранулярных люминесцирующих и тучных клетках выявляли сильные взаимодействия между катехоламинами/серотонином.

Серотониновый индекс (Js) в гранулярных люминесцирующих и тучных клетках стал выше единицы.

Через 2 часа после введение собственного костного мозга произошло резкое изменение взаимодействий между нейроаминами (табл. 2). В тучных клетках серотониновый индекс стал меньше единицы.

В миелограмме увеличилось как число лимфобластов с 11,1 до 13,8, так и бластных форм клеток с 2,1 до 3,6. Определялись митотически делящиеся лимфоциты. Усиливалась митотическая активность клеток, начиная с миелобластов.

При иммуногистохимическом исследовании

в костном мозге позитивными на белок p-53 регистрировались тучные клетки, однако их число снижалось до 2 на одно поле зрения по сравнению с интактными мышами (рис.). Интенсивность окраски почти во всех структурах костного мозга снижалась. Слабо экспрессировали белок p 53 ядра клеток эритроидного ряда. Выявляемость позитивных мегакариоцитов на белок p 53 достигала до 1-2 клетки на одно поле зрения (у интактных мышей 3-4 клетки).

Анализируя данные экспериментального исследования можно заключить, что аутопересадка костного мозга увеличивает содержание нейроаминов в костном мозге. Наблюдается возникновение новых островков размножения, около которых начинают располагаться вновь образующиеся биоаминсодержащие изучаемые клетки. Выявлено регуляторное звено, состоящее из комплекса клеток - из гранулярных люминесцирующих, ретикулярной клетки, макрофага и липоцита, которые содержат все изучаемые нейроамины и участвуют в размножении, дифференцировке, старении и умирании клеток в костном мозге.

У опытных мышей лимфоциты выявлялись с ярко люминесцирующими и тусклыми ядрами. По данным Л.А. Любовцевой (1993), происходило образование как Т - , так и В-лимфоцитов, так как разные популяции лимфоцитов при их образовании имели разное содержание нейроаминов

Анализируя данные корреляционных связей в костном мозге выявлено нейромедиаторное взаимодействие и воздействие нейроаминов в тандеме как в гранулярных люминесцирующих, так и в тучных клетках. Серотониновый индекс (Js) через 40 мин в обеих структурах был выше

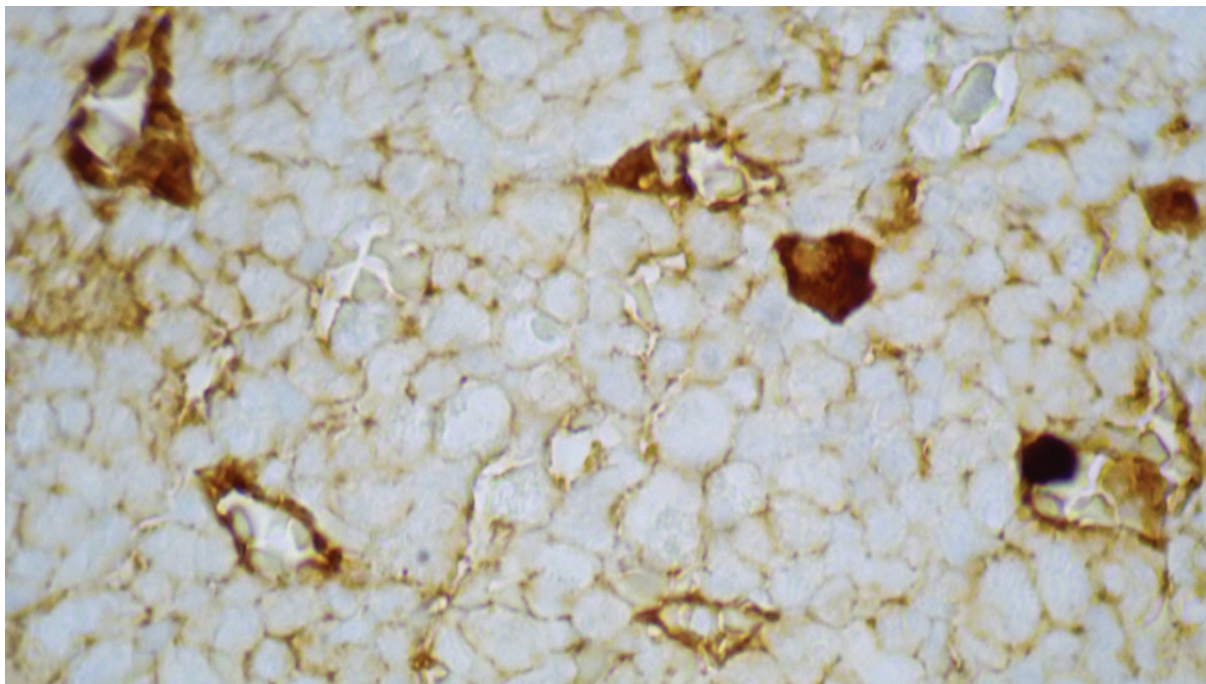


Рис. Срез костного мозга при аутопересадке: А. Гранулярные клетки; Б. Эндотелий сосуда; В. Тучные клетки. Иммуногистохимическая реакция на маркер белка р-53. Ув. 400.

единицы. Это свидетельствовало о том, что в этом процессе серотонин является ведущим нейромедиатором. А так как, этот моноамин обладает супрессивными свойствами в отношении бластных форм клеток и способствует дифференцировке зрелых форм, то не контролируемого размножения не наблюдалось, а происходило увеличение процентного содержания зрелых форм клеток. Более того, повышение серотонинового индекса указывало на усиленное образование лимфоцитов супрессоров.

Через 2 часа после введения собственного костного мозга происходило резкое изменение взаимодействий между нейромедиаторами. В тучных клетках серотониновый индекс стал меньше единицы, что свидетельствовало о том, что процесс кроветворения усиленно контролировался адренергическим звеном вегетативной нервной системы и со стороны деятельности тучных клеток.

Выводы:

1. В костном мозге выявлены нейромедиаторпродуцирующие клетки, образующие комплексы из гранулярных люминесцирующих клеток, макрофагов, лимфоцитов и ретикулярных клеток. Данные клетки сопряжены друг с другом.

2. При аутопересадке в костном мозге увеличилось число аминопредуцирующих клеток около вновь образующихся островков размножения. Аутопересадка костного мозга влияет на корреляционные связи между изучаемыми нейромедиаторами в гранулярных люминесцирующих и тучных клетках

костного мозга, тем самым изменяя функциональную направленность миелоидной и лимфоидной ткани во временном аспекте.

3. Аутопересадка костного мозга влияет на серотониновый индекс в нейромедиаторпродуцирующих клетках, тем самым изменяя процессы митотической и супрессивной активности клеток костного мозга во временном аспекте.

4. При аутопересадке костного мозга выявляется наибольшее число митотически делящихся клеток, что приводит к усиленному размножению клеток.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Агафонкин, С.А. Исследование биогенных аминов и биаминосодержащих структурах костного мозга человека при нарушении гемопоэза / С.А. Агафонкин // автореф. дис...канд. мед. наук. – М., 2006. – 25с.
2. Любовцева, Л.А. Люминесцентно-гистохимическое исследование аминосодержащих структур костного мозга, тимуса и крови при действии нейромедиаторов и антигенов / Л.А. Любовцева. - Чебоксары: Изд-во Чуваш.ун-та, 1993. - 100с.
3. Любовцева, Л.А., Любовцева, Е. В. Биоминсодержащие структуры костного мозга при системных заболеваниях крови/Л.А. Любовцева, Е.В. Любовцева // Морфология. - 2012. - №3. - С. 95-96.
4. Линдер, О.У. Тучные клетки как регуляторы тканевого гомеостаза и их место в ряду биологи-

ческих регуляторов / О.У. Линдер, Э.М. Коган // Архив патологии. – 1976. – Т. 38, № 8. – С. 3-14.

5. Boyce, J. A. *The biology of the mast cell* / J.A. Boyce // *Allergy and Asthma Proc.* 2004. – Vol. 25, №1. – P.27– 30.

6. Cross, S.A. M. *A study of the methods oavailable for the cytochemical Fnflammatory of histamine by fluorescence induced with o-phthalaldehyde or acetaldehyde* / S. A. M. Cross, S. W. B. Ewen, E. W.D. Rost // *J. Histochem.* – 1971. – №6. – P. 471–476.

7. Falck, B. *Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde* / B. Falck, N. A. Hillarp, G. Thieme, A. Torp // *J. Histochem. & Cytochem.* – 1962. – Vol. 10. – P. 348-354.

Авторская справка:

1. Любовева Любовь Алексеевна, д.б.н., профессор, заведующая кафедры общей и клинической морфологии и судебной медицины ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н.Ульянова» Тел. 89061336824

2. Воробьева Ольга Васильевна, к.м.н., доцент кафедры общей и клинической морфологии и судебной медицины ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н.Ульянова»; E-mail: olavorobeva@mail.ru

3. Любовева Евгения Вячеславовна, д.м.н., профессор, руководитель ГУЗ «Республиканский центр ВМИР» МИНЗДРАВА ЧР.