

МИКРОАНАЛИЗ НЕЙРОМЕДИАТОРОВ ПРИ ВВЕДЕНИИ ЧУЖЕРОДНОГО КОСТНОГО МОЗГА

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

MICROANALYSIS OF NEUROTRANSMITTERS IN THE INTRODUCTION OF FOREIGN BONE MARROW

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

ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный университет им. И.Н.Ульянова, кафедра общей и клинической морфологии и судебной медицины, Чебоксары, Россия (428000, Россия, Чебоксары, Московский проспект, 45).

Трансплантация костного мозга широко используется для лечения онкологических заболеваний и заболеваний, связанных с облученным костным мозгом. С помощью люминесцентно-гистохимических методов исследования изучены биоаминосодержащие структуры костного мозга, к которым относят гранулярные люминесцирующие и тучные клетки, участвующие в регуляции процессов кроветворения и иммуногенеза. Целью исследования является изучение влияния аллотрансплантации костного мозга на распределение нейроаминов в биоаминосодержащих структурах во временном аспекте. Нами выявлено, что через 40 минут после аллогенной пересадки костного мозга снижается число тучных и гранулярных клеток, с уменьшением гранул в них, в результате тотального распада. В этих клетках снижено содержание нейроаминов в результате чего нарушается миелограмма. В миелограмме резко снижается число зрелых форм лейкоцитов. Сделан вывод, что аллогенная трансплантация костного мозга вызывает супрессию синтеза нейроаминов в биоаминосодержащих клетках.

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

Bone marrow transplantation is widely used to treat cancer and diseases associated with the irradiated bone marrow. With luminescent-histochemical methods of research studied bioaminosoderzhaschie structure of the bone marrow, which include granular luminescent and mast cells involved in the regulation of immunogenesis. Objective: to study the effect of allograft bone marrow distribution in neyroaminov

bioaminsoderzhaschih structures in the temporal aspect. We found that in 40 minutes after allogeneic bone marrow transplantation, decrease in the number of mast cells and granule, with decreasing granules therein, resulting in total decomposition. In these cells, reduced content neyroaminov. The myelogram sharply reduced the number of white blood cells mature forms. It is concluded that the allogenic bone marrow transplantation suppresses synthesis neyroaminov in bioaminosoderzhaschih cells.

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

Введение. В настоящее время в лечении ряда заболеваний, таких как лейкозы, лимфома, множественная миелома, а также ряда других состояний: апластическая анемия, иммунологический синдром применяют пересадку костного мозга [1, 5]. Одновременно с максимальным уничтожением опухолевой ткани при трансплантации костного мозга подавляется иммунитет больного. Применение люминесцентно-гистохимических методов позволило ряду исследователей выявить и изучить биоаминосодержащие структуры костного мозга, которые участвуют в регуляции процессов кроветворения и иммуногенеза. Основными биоаминосодержащими клетками костного мозга являются гранулярные люминесцирующие клетки (ГЛК) и тучные клетки (ТК) [4, 7]. ГЛК крупнее тучных клеток, имеют гранулы разного цвета и размера, с разной интенсивностью люминесценции. ГЛК в костном мозге расположены около гемопоэтических островков размножения, мегакариоцитов, синусоидных капилляров. Выявлено, что в гранулах этих клеток содержатся катехоламины (КА), серотонин (СТ) и гистамин. ГЛК совместно с тучными клетками являются клетками-регуляторами и участвуют в автономной регуляции иммунологических и кроветворных органов.

Цель исследования - изучить влияние алло-

Таблица.

Миелограмма у интактных мышей и после аллопересадки костного мозга через 40 минут

Название клеток	Число клеток в норме	Аллопересадка
Бласты	3,4±0,83	7,6±0,83
Эритроидный ряд	28,7±0,1	60±0,1
Метамиелоциты эозинофильные	5,2±0,1	4,1±0,1
Метамиелоциты нейтрофильные	3,5±0,1	3,4±0,1
Палочкоядерные нейтрофилы	8,5±0,2	6,2±0,1
Мегакариоциты	0,7 ±0,1	0,9±0,1

Примечание: Расчет производили на 200 клеток. ± - амплитуда колебаний нейроаминов

трансплантации костного мозга на распределение нейроаминов в биоаминосодержащих структурах костного мозга.

Материал и методы исследования. Работа была выполнена на 40 мышах, которые были разделены на три группы:

1-я группа – интактные (n=10), 2-я - контрольная группа мышей (n=10), которым вводили физиологический раствор в дозе 1 мл.

3-я группа - производили аллотрансплантацию костного мозга. Животным вводили суспензию костного мозга, полученную из бедренной кости от мыши другой линии, 0,2 мл костного мозга помещали в 2 мл физиологического раствора и тщательно размешивали. 1 мл суспензии костного мозга вводили в хвостовую вену мыши. Другая часть объема полученной суспензии шла на подсчет числа клеток в полученной гетерогенной популяции клеток костного мозга с помощью проточного спектрофотометра «Ф-2000» с применением флуоресцеина изотиоцианата (FITC). Число клеток в 1 мл суспензии было равно $2,1 \cdot 10^8$.

Все процедуры по уходу осуществлялись по нормам и правилам обращения с лабораторными животными [2], в соответствии с «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985), правилами лабораторной практики в Российской Федерации (приказ МЗ РФ от 19.06.2003 №267).

В работе использовались люминесцентно-гистохимические методы Фалька-Хилларпа (1969) и Кросса, Эвена, Роста (1971) - для избирательного выявления нейроаминов. Количественно уровень КА, СТ и гистамина в структурах оценивались с помощью цитоспектрофлуориметрии. Окраска по А. Унна применялась для определения сульфатированности гепарина и состояния тучных клеток. Полученные цифровые данные обрабатывались статистически по специально разработанной программе «Statistica», версия 6 (Copyright@Stat Soft, 19842001, ИПЧИ 31415926535897). Определяли статистическую значимость различий.

Результаты исследования и их обсуждение. В результате исследования через 15 минут после аллотрансплантации костного мозга выявлено, что в гранулярных люминесцирующих и тучных клетках снижено в два раза содержание катехоламинов и серотонина. Выявлялись мегакариоциты, у которых содержание всех исследованных веществ было несколько повышено.

При окраске препаратов по Унна гемопоэтические клетки окрашивались одинаково ортохромно. Число тучных клеток снижалось до 1 – 2 клеток на несколько полей зрения. Они окрашивались В-метахроматично или ортохромно, что говорит о сниженной сульфатации этих клеток.

Через 40 минут при исследовании костного мозга отмечалось дальнейшее снижение содержания КА и СТ в клетках-регуляторах. Выявлялись округлые клетки со светящимися мелкими зернами и несветящимся бобовидным ядром (макрофаги). У мегакариоцитов не люминесцировали ядра, однако светилась цитоплазма. Нервные волокна не выявлялись.

ГЛК люминесцировали темно-оранжевым цветом и выявлялись в небольшом числе, полноценных клеток с хорошо заметными разнокалиберными гранулами до 0,2 мкм, было 1 – 2 на весь препарат, однако обнаруживались клетки, у которых люминесцировали 2 – 3 гранулы. Таких клеток было до 2 - 3 на одно поле зрения.

Аналогичная картина наблюдалась и с тучными клетками, выявлялись темно-оранжевые тени с расположенными рядом гранулами, размерами до 0,002 мкм. Произошел тотальный распад этих клеток. Такие клетки не содержали свободного гистамина.

При окраске препаратов по Унна определялись неправильной формы клетки с ортохромным (синим) ядром и неокрашенными гранулами разного размера. Тучные клетки имели гамма-метахроматичную окраску, клетки тотально распадались.

В миелограмме люминесцировали клетки эритроидного ряда, лимфоциты и ядра плазмоци-

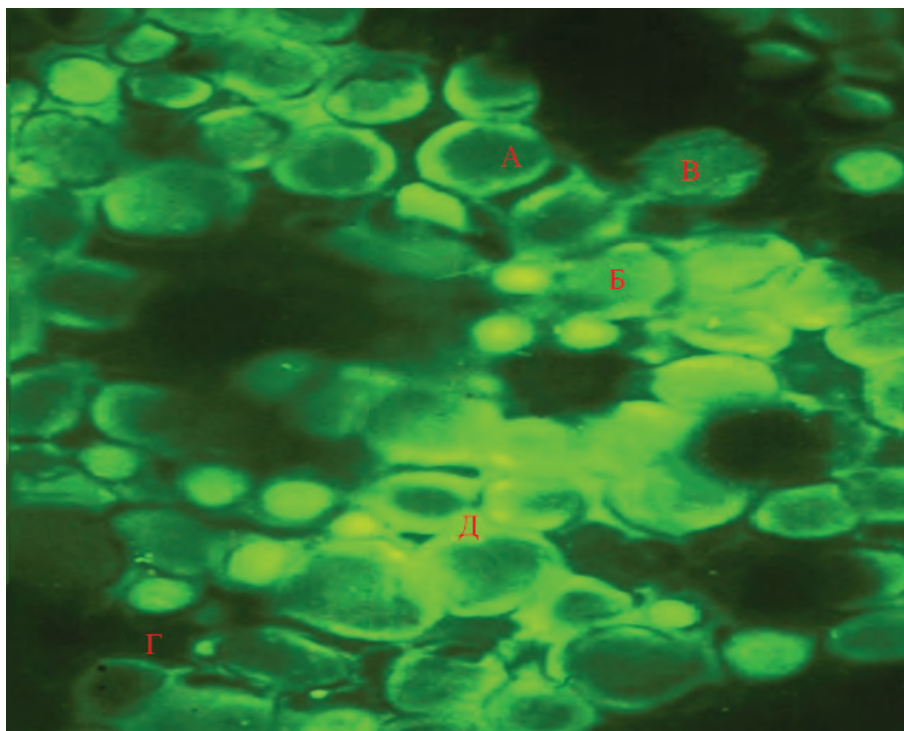


Рис. 1. Мазок костного мозга у контрольных мышей. Метод Кросса. МЛ-6. Ув. 400

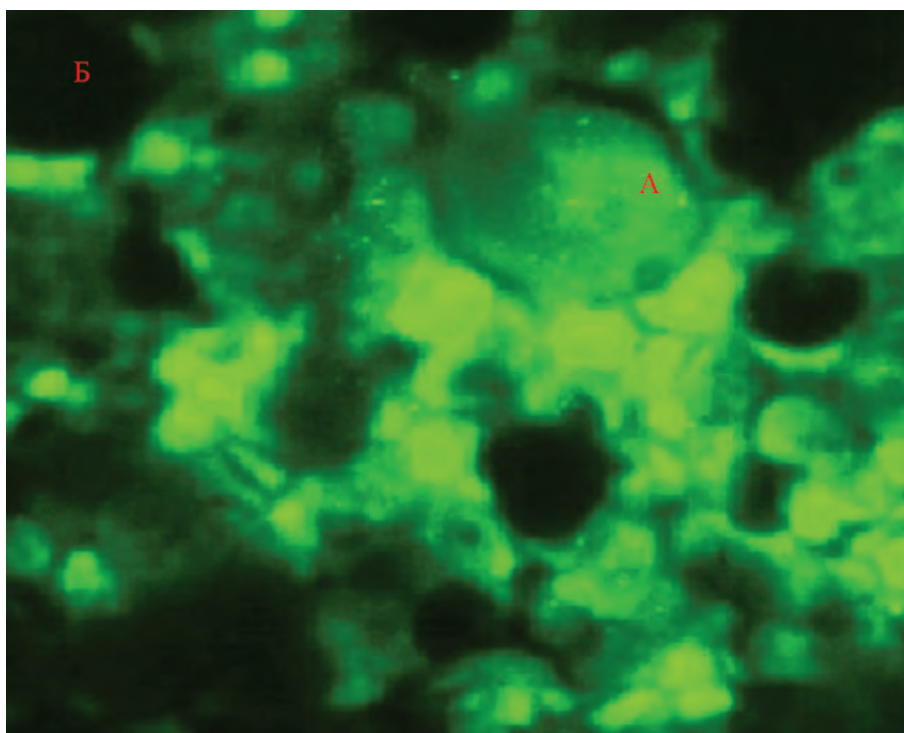


Рис. 2. Мазок костного мозга мыши после аллогенной пересадки костного мозга: а- мегакариоцит, б- липоцит, в- клетки эритроидного ряда. Метод Кросса. МЛ-6. Ув. 400.

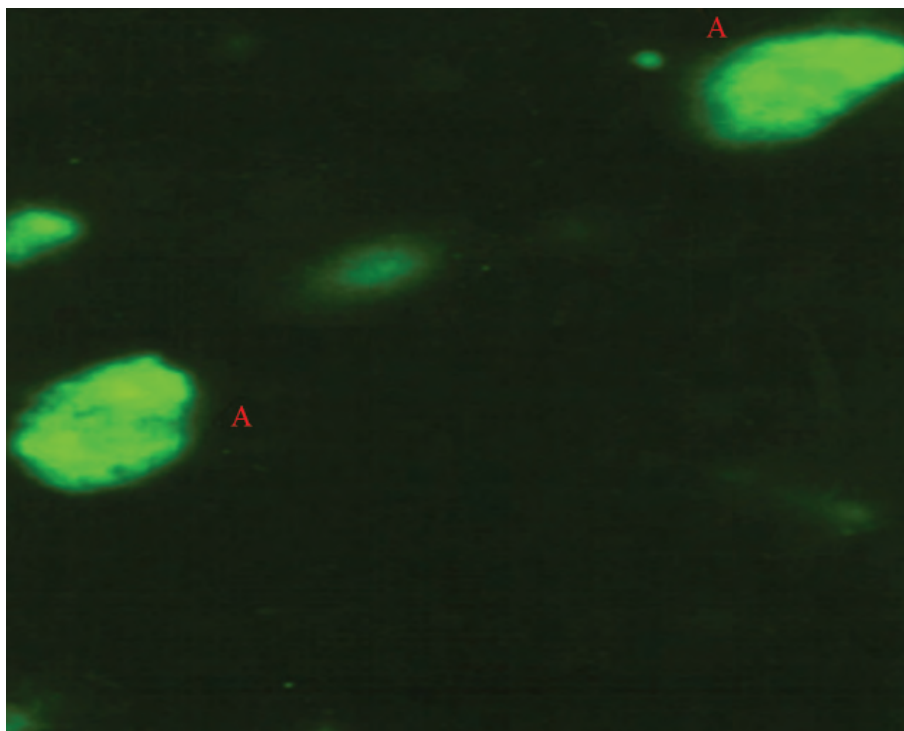


Рис. 3. Мазок костного мозга мыши после аллогенной пересадки костного мозга. А – тучная клетка. Метод Кросса. МЛ-6. Ув. 400

тов. Число клеток эритроидного ряда было резко повышенным, а число метамиелоцитов снижалось по сравнению с интактными животными (табл.1). Выявлялись мегакариоциты, у которых содержание всех исследованных веществ было несколько повышено.

Нами выявлено, что в костном мозге через 15 мин после аллогенной пересадки костного мозга происходило постепенное снижение числа тучных и ГЛК, содержание нейроаминов в них также снижалось. Уменьшалась сульфатированность гепарина во всех клетках костного мозга. Через 40 мин развивался тотальный распад тучных клеток и снижение числа люминесцирующих гранул в ГЛК с уменьшенным содержанием нейроаминов в них. Резко снижалось число зрелых форм лейкоцитов.

Наши исследования показывают, что аллогенная пересадка, вызывает подавление синтеза нейроаминов и распад клеток-регуляторов, вследствие чего основные функции костного мозга: митотическое деление молодых форм и их дифференцировка нарушались.

Вывод: Аллопересадка костного мозга вызывает глубинные изменения в синтезе нейроаминов, что ведет к перераспределению нейромедиаторов в как в самих биоаминосодержащих структурах костного мозга так и в межклеточном веществе, что приводит к нарушению его основных функций.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Арташян О. С. Морфологические аспекты участия тучных клеток в формировании общего адаптационного синдрома/ О.С. Арташян, Б.Г. Юшков, Ю.С. Храмцова // Таврический медико-биологический вестник. - 2012.— Т. 15.- № 3.- С. 22–25.
2. Любовцева Л.А., Любовцева Е. В. Биоаминсодержащие структуры костного мозга при системных заболеваниях крови/Л.А. Любовцева, Е.В. Любовцева // Морфология. - 2012. - №3. - С. 95-96.
3. Мелкова К.Н. Аллогенная трансплантация костного мозга: ключевые аспекты и основные этапы развития / К.Н. Мелкова// Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. -2012- Т.5.- №1.- С. 1-10.
4. Менделеева Л. П. Субпопуляции Т-лимфоцитов периферической крови больных гемобластозами на фоне трансфузий лимфоцитов донора после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток/ Л.П. Менделеева, Р.Ф. Богданов, И.В. Гальцева// Гематология и трансфузиология. -2013.- Т.58.- № 4.- С.5-12.
5. Ataergin S. Reduced dose of lenograstim is as efficacious as standard dose of filgrastim for peripheral blood stem cell mobilization and transplantation: A randomized study in patients undergoing autologous peripheral stem cell transplantation/ S. Ataergin, F. Arpacı // Am. J. Hematol.- 2008.- Vol. 83, №8.- P.

644–648.

6. *Relations between biological amines and immune characteristics* / L. Dobrodeeva, E. Sergeeva, V. Repina, O. Stavinskaya et al. // *World immune regulation meeting - Davos, Switzerland.* - 2008. - P. 100.

7. Ria R. Mangialardi *Comparison between filgrastim and lenograstim plus chemotherapy for mobilization of PBPCs* / R. Ria, T. Gasparre, G. Mangialardi et al. // *Bone Marrow Transplantation.* -2010. - Vol. 45. - P. 277–281.

REFERENCES:

1. Artashyan OS. *Morphological aspects of mast cells participate in the formation of the general adaptation syndrome* / OS Artashyan, BG Yushkov, YS Hramtsova // *Tauride Medical and Biological Bulletin.* - 2012. - T. 15. - № 3. - pp 22-25.

2. Lyubovtseva LA, Lyubovtseva EV *Bioaminsoderzhaschie structure of the bone marrow in systemic blood diseases* / LA. Lyubovtseva, EV Lyubovtseva // *Morphology.* - 2012. - №3. - S. 95-96.

3. Melkova KN *Allogeneic bone marrow transplantation: key aspects and main stages of development* / KN Melkova // *Clinical oncohematology. Basic research and clinical praktika.* -2012- T.5. - № 1. - S. 1-10.

4. Mendeleev LP *subpopulations of T-lymphocytes in peripheral blood of patients with hematological malignancies in the background of the donor lymphocyte transfusions after transplantation of allogeneic hematopoietic stem cell* / LP Mendeleev, RF Bogdanov IV Galtseva // *Hematology and transfuziologiya.* -2013. - № 4. - S.5-12 T.58.-.

5. Ataergin S. *Reduced dose of lenograstim is as efficacious as standard dose of filgrastim for peripheral blood stem cell mobilization and transplantation: A randomized study in patients undergoing autologous peripheral stem cell transplantation* / S. Ataergin, F. Arpacı // *Am. J. Hematol.* - 2008. - Vol. 83, №8. - P. 644–648.

6. *Relations between biological amines and immune characteristics* / L. Dobrodeeva, E. Sergeeva, V. Repina, O. Stavinskaya et al. // *World immune regulation meeting - Davos, Switzerland.* - 2008. - P. 100.

7. Ria R. Mangialardi *Comparison between filgrastim and lenograstim plus chemotherapy for mobilization of PBPCs* / R. Ria, T. Gasparre, G. Mangialardi et al. // *Bone Marrow Transplantation.* -2010. - Vol. 45. - P. 277–281.

Авторская справка:

1. Любовева Любовь Алексеевна, д.б.н., профессор, заведующая кафедры общей и клинической морфологии и судебной медицины ФГБОУ ВПО «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 ВПО «Чувашский государственный университет имени И.Н.Ульянова». Тел.: +7 937 373 42 23, e-mail: olavorobeva@mail.ru

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