

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ИНДОЛСОДЕРЖАЩИХ ВЕЩЕСТВ В СТРУКТУРАХ КОСТНОГО МОЗГА ПОСЛЕ ГЕТЕРОПЕРЕСАДКИ

Воробьева О.В.

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

THE LOCALIZATION OF INDOLE-CONTAINING SUBSTANCES IN BONE MARROW STRUCTURES AFTER HETEROGRAFTING

Vorob'eva OV

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

Для цитирования:

Воробьева О.В. Локализация индолсодержащих веществ в структурах костного мозга после гетеропересадки// Морфологические ведомости. - 2017.- Том 25.- № 2.- С. 51-53. [https://doi.org/10.20340/mv-mn.17\(25\).02.09](https://doi.org/10.20340/mv-mn.17(25).02.09)

For the citation:

Vorob'eva OV. The localization of indole-containing substances in bone marrow structures after heterografting. *Morphologicheskie Vedomosti – Morphological Newsletter*. 2017 Jun 30;25(2):51-53. [https://doi.org/10.20340/mv-mn.17\(25\).02.09](https://doi.org/10.20340/mv-mn.17(25).02.09)

Резюме. Изучена локализация индол-содержащих веществ и определено их влияние на структуры костного мозга. Эксперименты проведены на мышах-самцах, которым внутривенно вводили костный мозг, взятый от морских свинок. С помощью метода Массона-Фонтаны на ранних сроках после гетеропересадки наблюдается увеличение содержания индол-содержащих веществ в тучных, гранулярных, клетках эритроидного ряда, мегакариоцитах. К концу эксперимента тучные и гранулярные клетки не определяются, данные вещества выявляются в единичных гранулах. Происходит формирование жировых клеток, которые интенсивно импрегнируются индол-содержащими веществами. Наблюдается замещение структур костного мозга на липоциты и нарушаются процессы пролиферации клеток в костном мозге.

Ключевые слова: костный мозг, гетеропересадка, гранулярные клетки, тучные клетки

Summary. The localization of indole-containing substances and their impact on bone marrow structure was studied. Experiments were carried out on male mice which were intravenously injected with bone marrow taken from guinea pigs. Using the Masson-Fountains method in the early stages after heterografting it was observed that there was an increase in indole-containing substances content in mast, granule cells, in erythroid cells and megakaryocytes. By the end of the experiment mast and granule cells were not identified; these substances were detected in a few isolated granules. Formation of adipose cells, which were intensively impregnated by indole-containing substances took place. Replacement of bone marrow structures by lipocytes was observed. Processes of cells proliferation in the bone marrow were interrupted.

Key words: bone marrow, heterografting, granular cells, mast cells

Введение. Большая распространённость, высокая смертность и постоянный рост онкозаболеваний среди населения вызывают неуклонный интерес к изучению данной проблемы. Для диагностики и лечения этой группы заболеваний разрабатываются всё более новые методы диагностики и лечения; в этом направлении развивается новая отрасль биомедицины, получившая название тераностики [1-2]. Существенное значение придается выявлению нейромедиаторов гранулярных и тучных клеток красного костного мозга, которые с помощью мембранных рецепторов вступают во взаимодействие с другими клетками организма, включая опухолевые и, соответственно, участвуют в регуляции дифференцировки и пролиферации клеток [3-7]. Однако в литературе отсутствуют сведения о локализации индол-содержащих веществ в структурах костного мозга после введения чужеродного костного мозга. В связи с этим, эти вещества нами изучены в костном мозге.

Цель исследования - установление локализации индол-содержащих веществ в костном мозге после гетеропересадки во временном аспекте.

Материалы и методы исследования. В эксперименте использовали 3 группы мышей: 1 группа – интактные мыши без какого-либо воздействия (n=15); 2 группа – контрольные мыши (n=15), которым вводили 0,85 % физиологический раствор NaCl в дозе 1 мл/кг массы. На фоне введения раствора, в течение времени до 30 минут, отмечалось изменение содержания нейромедиаторов в красном костном мозге. В дальнейшем эти параметры уравнивались с интактными мышами, картина препаратов была идентичной. 3 группа (n=15) – гетерогенная пересадка 1 мл костного мозга, полученного из бедренной кости морских свинок, помещённого в 3 мл 0,9% физиологического раствора и тщательно размешенного. 1 мл полученной суспензии красного костного мозга вводили в хвостовую вену мыши. Число клеток в 1 мл суспензии было равно $2,1 \times 10^8$. Опытные животные содержались в стандартных условиях вивария со свободным доступом к корму. Мышей выводили из эксперимента через 40 мин, 60 мин, 4 часа, 1 сутки, 2 суток после процедуры гетеропересадки. Извлекали костный мозг и выявляли индол-содержащие вещества методом Массона-Фонтаны. Подсчет гранулярных и тучных клеток производили в 5 полях зрения микроскопа Люмам-6 (ЛОМО, Россия) при увеличении $\times 400$, диаметр зонда 0,5 мм. Использовался иммуногистохимический метод для выявления пролиферации клеток, экспрессирующих маркеры p-53. В эксперименте использовали поликлональные антитела к белку апоптоза p-53 (Santa Cruze, США). Иммуногистохимические реакции для выявления p-53 осуществляли в соответствии со стандартными протоколами на базе патологоанатомического отделения Республиканского клинического онкологического диспансера Минздравсоцразвития Чувашской Республики. Срезы костного мозга помещали на предметные стекла, обработанные L-polysine, которые в течение суток высушивали при комнатной температуре. С использованием иммуногистохимических автоконтэйнеров AUTOSTAINER-360 (THERMO, Великобритания) и Leica BOND-MAX (Германия) проводили окрашивание ручным и аппаратным способами.

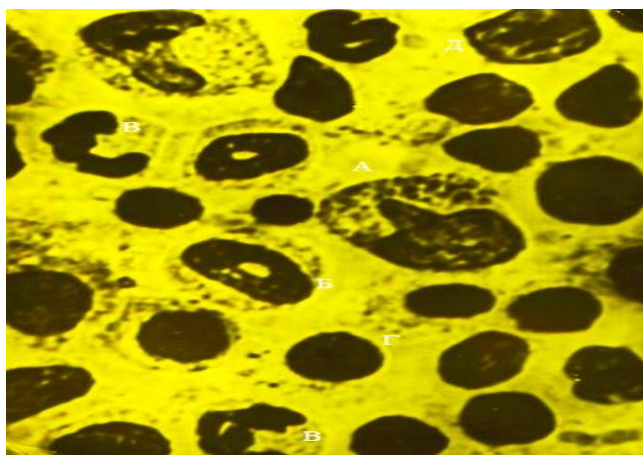


Рис. 1. Микрофото. Мазок красного костного мозга. Индолсодержащие клетки: А - эозинофилы; Б - палочкоядерные нейтрофилы; В - сегментоядерные нейтрофилы; Г - эритробласт; Д - миелоцит. Окр. методом Массона-Фонтаны. Ув.: x1000, иммерсия.

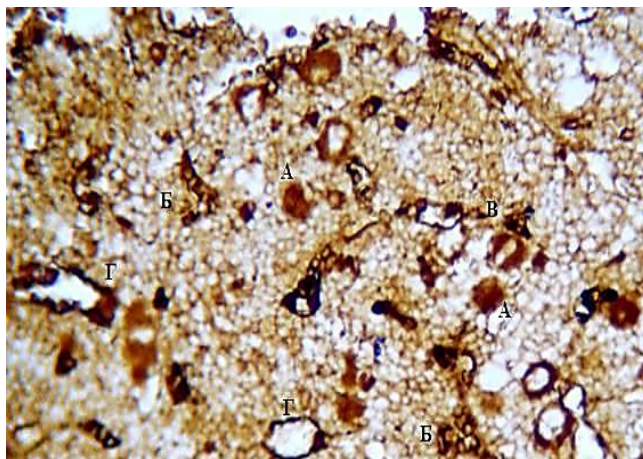


Рис. 2. Микрофото. Препарат костного мозга интактных мышей. Иммуногистохимическая реакция на маркер р-53. А - тучные клетки; Б - гранулярные клетки; В - нейтрофилы; Г - эндотелий. Ув.: x100.

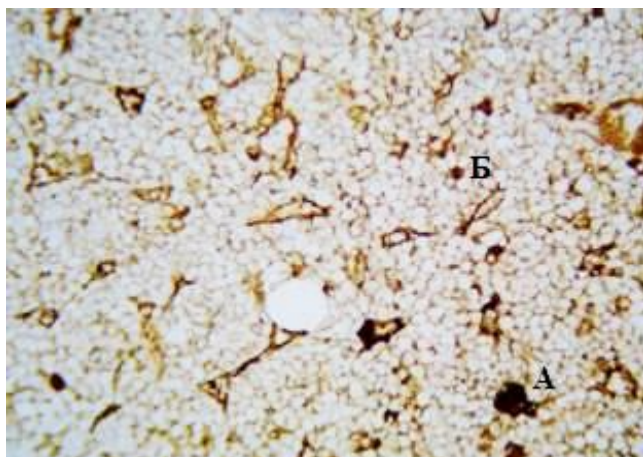


Рис. 3. Микрофото. Препарат костного мозга мышей после гетеропересадки. Иммуногистохимическая реакция на маркер р-53. А - тучные клетки; Б - лимфоциты. Ув.: x100.

плазмобластов, лимфоцитах, а также в единичных гранулах тучных клеток. Через 2-е суток их содержание претерпевает изменения с прогрессивным уменьшением содержания в структурах костного мозга. Полностью перестают выявляться тучные и гранулярные клетки, индол-содержащие вещества выявляются лишь в единичных гранулах клеток. Продолжает увеличиваться число положительно импрегнированных жировых клеток. При иммуногистохимической реакции на белок р53

Для визуализации продуктов иммунной реакции использовали стрептавидин-биотиновый пероксидазный метод («Dako», LSAB+Kit, HRP), в качестве красящего соединения применяли раствор диаминобензидаина («Dako», Liquid DAB+), докраска ядер осуществлялась гематоксилином. Положительной экспрессией белка р53 считалось наличие специфической коричневой окраски ядер клеток. На все эксперименты было получено разрешение локальной этической комиссии университета. Все манипуляции на животных проводили согласно международным и отечественным этическим и научным стандартам планирования и выполнения исследований на животных (приказ МЗ и СР РФ от 23.08.2010 г. № 708н «Правила лабораторной практики», приложения к приказу Минздрава СССР от 12.08.1977 г. № 755 и приказу Минсельхоза РФ от 05.11.2008 г. № 490 «Об утверждении правил проведения лабораторных исследований в области ветеринарии»; Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, ЕЭС, Страсбург, 1985; требования Хельсинкской декларации и Всемирной медицинской ассоциации, 2000; рекомендации, содержащиеся в Директивах Европейского сообщества, 86/609 EC).

Результаты исследования и обсуждение. По данным метода Массона – Фонтаны, у экспериментальных мышей после гетеропересадки через 40 мин в костном мозге индол-содержащие вещества определяются в тучных клетках, в зернистости эозинофилов и гранулярных клетках, выявляемых при люминесцентно-гистохимических методах в виде гранулярных люминесцирующих клеток [5]. В нейтрофилах, бластных формах клеток, это вещество выявляется в хроматине. В большинстве гемопоэтических клеток, данное вещество практически не определяется, за исключением клеток эритроидного ряда, мегакариоцитов и хроматина плазмоцитов (рис. 1). Через 60 мин после гетерогенной пересадки максимальное содержание индол-содержащих веществ выявляется в единичных гранулярных клетках, с единичными разнокалиберными гранулами, а также в бластных формах. В клетках эритроидного ряда, мегакариоцитах, в зернистости и ядрах клеток эозинофильного ряда индол-содержащие вещества определяются в виде следов. Через 4 часа после гетеропересадки минимальное содержание индол-содержащих веществ выявляется во всех структурах костного мозга, за исключением лимфоцитов и мегакариоцитов, где эти вещества сохраняются на высоком уровне.

Через сутки после гетерогенной пересадки костного мозга исследуемые вещества появляются в эндотелиальных клетках сосудов, в гранулярных клетках, имеющие разного размера гранулы: от светло-коричневого до черного цвета. Число таких клеток невелико, примерно одна на 5 полей зрения. Появляется положительно импрегнированная цитоплазма жировых клеток, около которых концентрируются мелкие тучные клетки. Кроме того, индол-содержащие вещества в небольшом содержании определяются в ядрах плазмоцитов, плазмобластов, лимфоцитах, а также в единичных гранулах тучных клеток. Через 2-е суток их содержание претерпевает изменения с прогрессивным уменьшением содержания в структурах костного мозга. Полностью перестают выявляться тучные и гранулярные клетки, индол-содержащие вещества выявляются лишь в единичных гранулах клеток. Продолжает увеличиваться число положительно импрегнированных жировых клеток. При иммуногистохимической реакции на белок р53

в костном мозге мышей его экспрессия отмечается в ядрах тучных и гранулярных клетках, однако их число невелико. Мегакарициты имеют слабую позитивную реакцию, в препаратах определяется большое число лимфоцитов, до 17 клеток на несколько полей зрения, отсутствуют митотически делящиеся клетки, отмечается значительное снижение интенсивности окраски в остальных структурах костного мозга (рис. 2-3).

Заключение. Таким образом, по результатам данного исследования можно заключить, что через 40 мин после гетеропересадки в костном мозге индол-содержащие вещества избирательно локализируются в тучных и гранулярных клетках, клетках эритроидного ряда, мегакариocyтах, т.е. отмечается активация некоторых гемопоэтических ростков в костном мозге [8]. Через 60 мин максимальное содержание данных веществ в разных структурах костного мозга различается. Через 4 часа высокое содержание индол-содержащих веществ наблюдается в лимфоцитах и мегакариocyтах, в остальных структурах содержание минимально. Через сутки данные вещества определяются в единичных гранулярных клетках, число которых значительно снижено. К концу эксперимента тучные и гранулярные клетки перестают выявляться, однако определяется положительно импрегнированные ядра жировых клеток, около которого располагаются мелкие тучные клетки. Это указывает на нарушенную дифференцировку клеток костного мозга и замещение функционально активных клеток костного мозга на липоциты [5]. При иммуногистохимической реакции выявляется снижение процессов пролиферации с отсутствием митотически делящихся клеток. Однако определяется повышенное число лимфоцитов, возможно, мигрировавших в костный мозг из крови в ответ на антигенное воздействие [6-7]. В целом, при гетеропересадке в костном мозге на ранних сроках наблюдается увеличение содержания индол-содержащих веществ в тучных, гранулярных, клетках эритроидного ряда, мегакариocyтах. К концу эксперимента тучные и гранулярные клетки не определяются, индол-содержащие вещества выявляются в единичных гранулах, происходит также образование жировых клеток, которые этими веществами интенсивно импрегнируются.

ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Цыганова Н.А., Хайруллин Р.М., Терентюк Г.С., Хлебцов Б.Н., Богатырев В.А., Дыкман Л.А., Ерыков С.Н., Хлебцов Н.Г. Проницаемость пегилированных золотых наночастиц через гематоплацентарный барьер крыс// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.- 2014.- Т. 157.- № 3.- С. 366-369.
2. Stolbovskaya O.V., Khairullin R.M., Saenko Y.V., Krasnikova E.S., Krasnikov A.V., Fomin A.A., Skaptsov A.A. In vitro metabolism study of normal and tumor cells when exposed to red led light/ В сборнике: Progress in Biomedical Optics and Imaging - Proceedings of SPIE 3. Сер. "Saratov Fall Meeting 2015 - Third International Symposium on Optics and Biophotonics; and Seventh Finnish-Russian Photonics and Laser Symposium (PALS)" 2016. С. 99171Q.
3. Агафонкин С.А. Исследование биогенных аминов и биаминосодержащих структурах костного мозга человека при нарушении гемопоэза. Автореф. дисс. ... канд. мед. наук.– М., 2006.– 25с.
4. Быков В.Л. Развитие и гетерогенность тучных клеток// Морфология.– 2000.– Т. 117.- № 2.- С. 86-92.
5. Воробьева О.В., Любовцева Л.А. Воздействие гетеротрансплантации на нейромедиаторы в структурах костного мозга// Морфологические ведомости.– 2015.- № 4.- С. 54-58.
6. Воробьева О.В., Любовцева Л.А., Любовцева Е.В. Микроанализ нейромедиаторов при введении чужеродного костного мозга// Морфологические ведомости.– 2015.- № 3.– С.41-45.
7. Воробьева О.В. Нейромедиаторные биогенные амины в структурах костного мозга при аллопересадке// Морфологические ведомости.– 2016.- Т. 24.- № 4.– С. 89-91.
8. Boyce JA. The biology of the mast cell. Allergy and Asthma Proc. 2004;25,(1):27-30.

Авторская справка

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