№ 4 - 2015 г.
14.00.00 медицинские науки
(14.03.00 Медико-биологические науки)

УДК 616.71-018.46-089.843-092.9-076.5

ЛЮМИНЕСЦЕНТНО-ГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НЕЙРОАМИНОВ ПРИ ГЕТЕРОТРАНСПЛАНТАЦИИ КОСТНОГО МОЗГА

О. В. Воробьева[1], Л. А. Любовцева[1], Е. В. Любовцева[2,3]

[1]ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный университет им. И. Н. Ульянова» (г. Чебоксары, Чувашская Республика)
[2]БУ «Республиканское бюро судебно-медицинской экспертизы» (г. Чебоксары, Чувашская Республика)
[3]ГУЗ «Республиканский центр ВМИР» (г. Чебоксары, Чувашская Республика)

В эксперименте изучено влияние гетеропересадки костного мозга на распределение биогенных аминов между биоаминосодержащими структурами костного мозга. *Методы исследования*. Под глубоким эфирным наркозом брали из бедренной кости 1 мл костного мозга кошки помещали в 2 мл физиологического раствора и тщательно размешивали. 1 мл суспензии костного мозга вводили в хвостовую вену мышам. Число клеток в 1 мл суспензии было равно $2{,}1 \times 10^8$. В дальнейшем производили люминесцентно-гистохимическое исследование. *Результаты исследования*. После гетеропересадки костного мозга гранулярные и тучные клетки постепенно перестают синтезировать нейроамины, разрушаются, а новые популяции не образуются. Появляются гистамин-положительные плазмобласты, изменяется миелограмма. Выявлено, что чужой костный мозг вызывает супрессию синтеза биогенных аминов и распад клеток-регуляторов. *Вывод:* происходит постепенное опустошение собственных клеток от нейроаминов, быстрое старение и гибель костного мозга.

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

Воробьева Ольга Васильевна — кандидат медицинских наук, доцент кафедры общей и клинической морфологии и судебной медицины ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный университет имени И. Н. Ульянова», г. Чебоксары, e-mail: olavorobeva@mail.ru

Любовцева Любовь Алексеевна — доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой общей и клинической морфологии и судебной медицины ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный университет имени И. Н. Ульянова», г. Чебоксары, e-mail: olavorobeva@mail.ru

Любовцева Евгения Вячеславовна — доктор медицинских наук, профессор, заведующий БУ «Республиканское бюро судебно-медицинской экспертизы», руководитель ГУЗ «Республиканский центр ВМИР», г. Чебоксары, e-mail: olavorobeva@mail.ru

---

Актуальность проблемы. Применение люминесцентно-гистохимических методов позволило ряду исследователей выявить и изучить биоаминосодержащие структуры костного мозга, которые участвуют в регуляции процессов иммуногенеза [1]. Как известно, регуляция многих органов на месте происходит при помощи особых биоаминсодержащих структур, в состав которых входят многие компоненты, в том числе тучные (ТК) и гранулярные люминесцирующие клетки (ГЛК) [4, 5]. Выявлено, что в гранулах этих клеток содержатся катехоламины (КА), серотонин (СТ) и гистамин [7]. ГЛК совместно с ТК являются клетками-регуляторами и участвуют в автономной регуляции иммунологических и кроветворных органов.

Цель исследования: изучение влияния гетеропересадки костного мозга на распределение биогенных аминов между биоаминосодержащими структурами костного мозга.

Материал и методы исследования. Экспериментальные исследования проведены на 45-ти мышах, 1-я группа — интактные мыши (n = 15), 2-я группа — контрольная группа мышей (n = 15), у которых нейроаминные сдвиги в гранулярных и ТК костного мозга происходят в первые 30 мин после введения физиологического раствора в дозе 1 мл, далее их количество в клетках стабилизируется. Вследствие этого материал для изучения брали через 40 мин после введения костного мозга. В 3-й группе производили гетеротрансплантацию костного мозга. Под глубоким эфирным наркозом брали из бедренной кости 1 мл костного мозга кошки, помещали в 2 мл физиологического раствора и тщательно размешивали. 1 мл суспензии костного мозга вводили в хвостовую вену мышам. 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 $2{,}1 \times 10^8$ [2, 3]. Выведение животных из эксперимента проводилось на сроке 40 мин высокой дозой наркоза [6]. Уход и все процедуры по уходу осуществлялись по нормам и правилам обращения с лабораторными животными 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).

Нами использовались следующие методы исследования:

1. Люминесцентно-гистохимический метод [8] для выявления гистамина.
2. Для избирательного выявления КА и СТ применялся люминесцентно-гистохимический метод Фалька-Хилларпа.
3. Количественно уровень КА, СТ и гистамина в структурах оценивались с помощью цитоспектрофлуориметрии.
4. Представление о количественном распределении ТК и ГЛК дает метод подсчета их в 5-ти полях зрения микроскопа при увеличении об. 40, ок. 10.
5. Окраска полихромным толуидиновым синим по Унна применяли для определения степени сульфатированности гепарина и состояния ТК (Ромейс Б., 1954). Ортохромную (голубую) окраску дает моно- и дисульфатированный, незрелый гепарин. Бета-метахроматическую (чернильно-фиолетовую) дает трехсульфатированный, созревающий гепарин и гамма-метахроматическая (пурпурная) окраска присуща

зрелому, пятисульфатированному гепарину.
6. Миелограмму исследовали в расчете на 500 клеток после окраски препаратов по Паппенгейму.
7. Полученные цифровые данные обрабатывались статистически по специально разработанной программе «Statistica», версия 6 (Copyright@Stat Soft, 19842001, ИПЧИ 31415926535897).

Результаты исследования и обсуждение. Исследования показали, что в препаратах костного мозга через 40 мин после гетеропересадки костного мозга нами обнаружены ГЛК, число которых снижено по сравнению с интактными животными. Содержание КА и СТ в них увеличено (рис. 1).

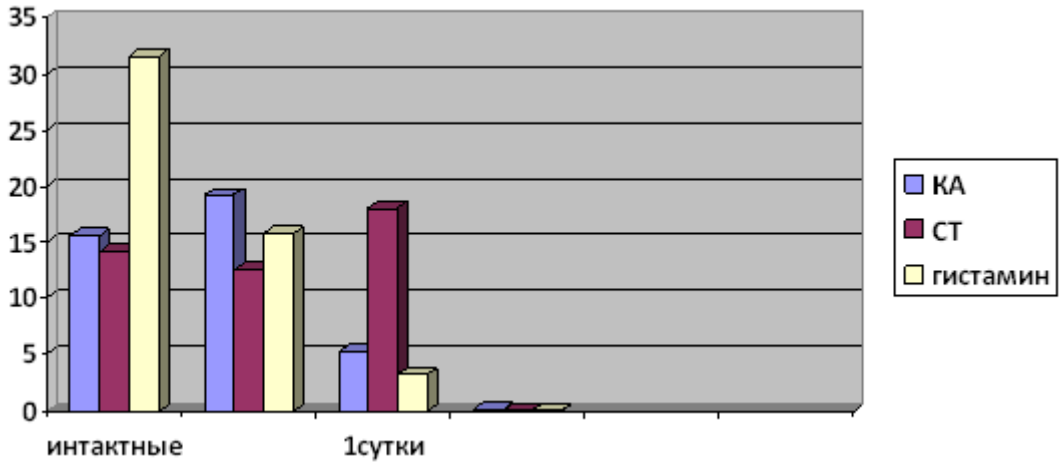

Рис. 1. Показатели интенсивности люминесценции нейроаминов в ГЛК после гетеропересадки костного мозга во временном аспекте (у.е.)

Вторым видом аминопродуцирующих клеток являются ТК, число которых увеличено в 2,5 раза по сравнению с интактными животными. Отмечено увеличение в них КА, а СТ — снижено. Появляются КА в цитоплазме нейтрофилов и моноцитов. В миелограмме наблюдается увеличение числа клеток эритроидного ряда за счет незначительного повышения количества базофильных и оксифильных нормоцитов.

При исследовании на гистамин выявляется снижение числа гистаминсодержащих ГЛК, в них остается люминесцирующими 1–2 гранулы. Происходит истощение аминов в гранулах этих клеток.

Число ТК увеличивается в 2,5 раза, однако содержание гистамина в них снижено. Эритроциты полностью люминесцируют, т. е. содержат в себе гистамин в отличие от интактных мышей. Это говорит о том, что излишки межклеточного гистамина адсорбируются гликокаликсом этих клеток.

В миелограмме определяется увеличение процентного содержания миелобластов, клеток эозинофильного ряда, нейтрофильных метамиелоцитов и снижение числа палочко- и сегментоядерных нейтрофилов с одновременным выбросом их в кровь. Увеличивается число лимфоцитов, снижается число плазмоцитов.

При исследовании препаратов костного мозга методом Массона-Фонтаны СТ и его метаболиты в костном мозге определяются в виде следов в ядрах клеток эритроидного ряда, мегакариоцитах, в зернистости и ядрах клеток эозинофильного ряда. Появляются единичные бластные формы, где это вещество определяется в наибольшем количестве на +5.

Все клетки имеют ортохромную окраску. Однако в цитоплазме миелобластов, эозинофильных миелоцитов, эритробластов появляется слабая гамма-метахромазия. ТК имеют интенсивную бета-метахромазию.

Через 1 сутки ГЛК единичны, содержание СТ в них понижено, однако количество КА остается выше нормы. ТК начинают определяться около липоцитов. Они мелкие, зеленые, число их снижено. В них снижено содержание СТ и КА (рис. 2).

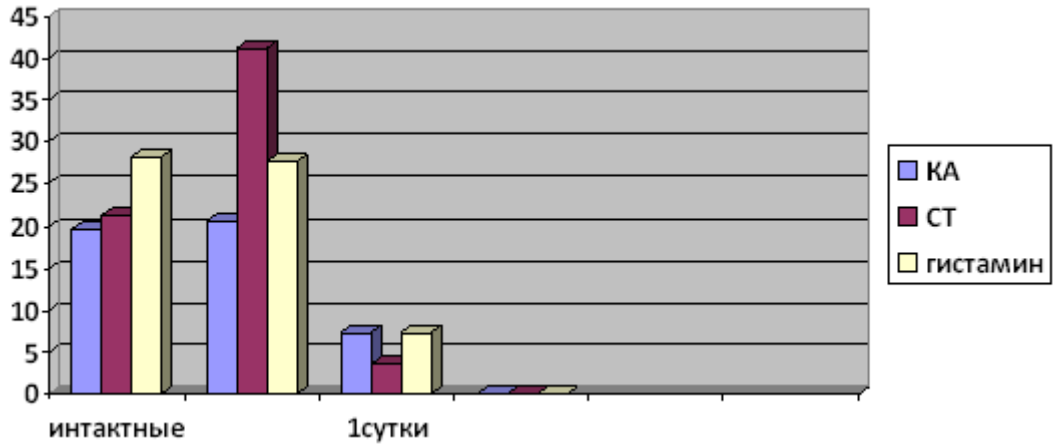

Рис. 2. Показатели интенсивности люминесценции нейроаминов в ТК после гетеропересадки костного мозга во временном аспекте (у.е.)

Выявляются мелкие клетки с бобовидным ядром, имеющие одинаковую зернистость. Появляется новая генерация макрофагов, располагающихся в основном вокруг жировых клеток. АПУД-клеток очень мало, до 4,1 на весь препарат. Постепенно образуется белая жировая ткань, в которой накапливаются как КА, так и СТ. Около гемопоэтических островков размножения и липоцитов обнаруживаются отдельные фрагменты нервных волокон.

Выявляется, что содержание гистамина в структурах остается сниженным. В ГЛК определяются единичные люминесцирующие гранулы с резко сниженным содержанием гистамина.

Число ТК не увеличивается, более того наблюдается еще большее снижение в них гистамина.

Появляются белые жировые клетки, содержание гистамина в которых повышается в 1,4 раза. Появляются гистаминположительные плазмобласты.

В миелограмме снижается число миелобластов и эозинофилов, и увеличивается число юных форм (миелоцитов и метамиелоцитов). В цитоплазме эозинофилов появляются базофильные гранулы. ТК разрушены. В большом числе выявляются макрофаги с цитоплазматическими включениями. Обнаруживается увеличение лимфоцитоподобных клеток и липоцитов.

Появляются липоциты, около которых располагаются кровеносные сосуды и мелкие ортохромные ТК.

Через 2-е суток после гетерогенной пересадки костного мозга люминесцируют лишь единичные гранулы в гранулярных клетках. В отдельных гранулах содержание КА повышено, а СТ — снижено.

Происходит дальнейшее увеличение жировой ткани, около ее клеток увеличивается

число ТК, однако размеры мельче обычных в 1,4 раза. В них содержание КА и СТ снижено. Очевидно, это молодые формы ТК. Нервные волокна определяются в виде отдельных фрагментов в основном около групп жировых клеток.

Число положительно импрегнированных жировых клеток резко возросло.
В гепопоэтических клетках метахромазия не обнаруживается, что говорит о полном отсутствии сульфатации гепарина. Очень много ортохромных жировых клеток на разной стадии созревания. Появляются единичные, интенсивно окрашенные лимфобласты.
ТК определяются только между жировых клеток. Они окрашиваются бета-метахроматично и в таком состоянии разрушаются.

Регистрируется сниженное содержание гистамина во всех структурах этого органа.
В гранулярных клетках люминесцируют единичные гранулы, происходит их полный распад. Образуются поля из таких гранул.

Увеличивается число люминесцирующих липоцитов. В них гистамин определяется в ядрах, оболочках этих клеток и части цитоплазмы вокруг ядра. Около липоцитов располагаются мелкие, зеленые, слабо люминесцирующие ТК. Мегакариоциты — тусклые, гистамин в них выявляется в виде ободка около цитолеммы и в ядре.

В миелограмме наблюдается распад клеточных форм. Много обломков клеток. Наблюдается выброс гранул из эозинофилов, нейтрофилов. Число липоцитов увеличивается в 3,5 раза, также увеличивается их размер.

Таким образом, при гетеропересадке в костном мозге происходит нарушение регуляции и дифференцировка клеток. Снижение содержания СТ, КА вследствие разрушения биоаминпродуцирующих клеток приводит вначале к появлению лимфоцитоподобных клеток, а в дальнейшем к разрушению клеток костного мозга. ГЛК и ТК перестают синтезировать нейроамины, разрушаются, а новые популяции не образуются. Подвергаются тотальной дегрануляции. Угнетается синтез гепарина вплоть до полного отсутствия сульфатации.

Выводы

1. После гетеропересадки развивается постепенная супрессия синтеза нейроаминов в аминосодержащих структурах, истощение депо биогенных аминов и накоплением их в липоцитах.
2. Происходит выброс и опустошение клеток от нейроаминов, приводящий к изменению дифференцировки клеток в костном мозге.
3. Происходит опустошение собственных клеток костного мозга от нейроаминов с последующим жировым перерождение костного мозга. Происходит гибель клеток — продуцентов нейроаминов в костном мозге.

Список литературы

1. Гривцова Л. Ю. Субпопуляции трасплантируемых стволовых кроветворных клеток / Л. Ю. Гривцова, Н. Н. Тупицын // Онкогематология. — 2006. — Т. 8, № 1. — С. 65–71.
2. Количественный учет гемопоэтических стволовых клеток. Проточная цитометрия в медицине и биологии / Е. Е. Зуева [и др.]. — Алматы, 2011. — 261 с.
3. Карноухов Н. А. Люминесцентные параметры ядерных клеток крови в процессе иммунного ответа организма / Н. А. Карноухов // Биофизика. — 1984. — № 2. — С. 276–279.
4. Любовцева Л. А. Биоаминсодержащие структуры костного мозга при системных заболеваниях крови / Л. А. Любовцева, Е. В. Любовцева // Морфология. — 2012. — № 3.

— С. 95–96.
5. Богданов Р. Ф. Субпопуляции Т-лимфоцитов периферической крови больных гемобластозами на фоне трасфузий лимфоцитов донора после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток / Р. Ф. Богданов, И. В. Гальцева // Гематология и трансфузиология. — 2013. — Т. 58, № 4. — С. 5–12.
6. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях / Под ред. Н. Н. Каркищенко, С. В. Грачева. — М. : Медицина, 2010. — 344 с.
7. Ставинская О. А. Роль гистамина и серотонина в поддержании иммунного гомеостаза. Национальная конференция «Аллергология и клиническая иммунология — междисциплинарные проблемы» / О. А. Ставинская // Рос. аллергол. журн. — 2008. — № 1. — С. 283–285.
8. Cross S. A. M. A Stindi of the methods available for the cytochhem : cal localization of histamine by fluorescence induced with o-phthalaldehyde or acetadehude / S. A. M. Cross, S. W. B. Ewen, E. W. D. Rost // J. Histochem. — 1971. — Vol. 6. — P. 471–476.

LUMINESCENT AND HISTOCHEMICAL RESEARCH OF NEUROAMINES AT MARROW HETEROTRANSPLANTATION

O. V. Vorobyeva[1], L. A. Lyubovtseva[1], E. V. Lyubovtseva[2,3]

[1]FSBEI HPE «Chuvash state university n. a. I. N. Ulyanov» (Cheboksary, The Chuvash Republic)
[2]BE «Republican Bureau of Forensic Medical Examination» (Cheboksary, The Chuvash Republic)
[3]SHE «Republican Center of RMAR» (Cheboksary, The Chuvash Republic)

Influence of marrow heterotransplantation on distribution of biogenic amines between bioaminocontaining marrow structures is studied during the experiment. *Research methods.* Under a deep etherization 1 ml of a cat's marrow from a femur was placed in 2 ml of normal saline solution and carefully stirred. 1 ml of suspension of marrow was entered into a caudal vein to mice. The cells amount was $2{,}1 \times 10^8$ peer 1 ml of suspension. Luminescent and histochemical research was performed after that. *Results of research*. After marrow heterotransplantation granular and mast cells gradually cease to synthesize neuroamines, then blasted, and new populations aren't formed. Histamine-positive plasmablasts upstart, myelogram changes. It is revealed that non self marrow causes a suppression of biogenic amines synthesis and disintegration of cells regulators. *Conclusion*: there is a gradual devastation of self cells from neuroamines, fast aging and marrow death.

***Keywords**:* marrow heterotransplantation, catecholamins (CA), serotonin (ST), histamine, granular luminescing cells (GLC), mast cells (MC), megacaryocytes (MCC).

About authors:

Vorobyeva Olga Vasilyevna — candidate of medical science, assistant professor of chair of general and clinical morphology and forensic medicine at FSBEI HPE «Chuvash state university n. a. I. N. Ulyanov», e-mail: olavorobeva@mail.ru

Lyubovtseva Lyubov Alekseevna — doctor of biological science, professor, head of chair of general and clinical morphology and forensic medicine at FSBEI HPE «Chuvash state university n. a. I. N. Ulyanov», e-mail: olavorobeva@mail.ru

Lyubovtseva Evgenia Vyacheslavovna — doctor of medical science, professor, head of BE «Republican Bureau of Forensic Medical Examination», principal of SHE «Republican Center of RMAR», e-mail: olavorobeva@mail.ru

List of the Literature:

1. Grivtsova L. Y. Subpopulations transplant of hematopoietic stem cells / L. Y. Grivtsova, N. N. Tupitsyn // Haemato-oncology. — 2006. — Vol. 8, N 1. — P. 65–71.
2. Quantitative accounting of haematopoietic stem cells. Flowing cytometry in medicine and biology / E. E. Zuyeva [et al.]. — Almaty, 2011. — 261 p.

3. Karnoukhov N. A. Luminescent parameters of nuclear blood cells in the course of the immune reaction of the body / N. A. Karnoukhov // Biophysics. — 1984. — N 2. — P. 276–279.
4. Lyubovtseva L. A. Bioaminocontaining marrow structures at general diseases of blood / L. A. Lyubovtseva, E. V. Lyubovtseva // Morphology. — 2012. — N 3. — P. 95–96.
5. Bogdanov R. F. Subpopulations of T-lymphocytes of peripheric blood of patients with hemoblastoses against transfusion of lymphocytes of the donor after transplantation of haematopoietic stem cells / R. F. Bogdanov, I. V. Galtseva // Hematology and transfusiology. — 2013. — Vol. 58, N 4. — P. 5–12.
6. The guide to laboratory animals and alternative models in biomedical technologies / Under the editorship of N. N. Karkishchenko, S. V. Grachev. — M. : Medicine, 2010. — 344 p.
7. Stavinsky O. A. Role of histamine and serotonin in maintenance of immune homeostasis. The national conference «Allergology and Clinical Immunology — Interdisciplinary Problems» / O. A. Stavinskaya // Rus. journal of allergology. — 2008. — N 1. — P. 283–285.
8. Cross S. A. M. A Stindi of the methods available for the cytochhem : cal localization of histamine by fluorescence induced with o-phthalaldehyde or acetadehude / S. A. M. Cross, S. W. B. Ewen, E. W. D. Rost // J. Histochem. — 1971. — Vol. 6. — P. 471–476.