

УДК [599.323.4–114.4:616–089.843]^591/434/2
© О. В. Воробьева, 2017
doi: 10.18499/2225-7357-2017-6-1-12-16

ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКОЕ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУР АППЕНДИКСА ПОСЛЕ АЛЛОГЕННОЙ ПЕРЕСАДКИ КОСТНОГО МОЗГА

О. В. Воробьева

ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И. Н. Ульянова»,
г. Чебоксары, Россия

Изучена динамика изменений нейроамин содержащих структур аппендикса после аллотрансплантации костного мозга. Через 40 мин выявляется увеличение числа гранулярных люминесцирующих и тучных клеток с численным повышением содержания в них катехоламинов и серотонина. Кроме того, выявлено увеличение серотонинового индекса, указывающее на контролирующее влияние серотонина над процессами пролиферации, дифференцировки клеточных форм в оболочках аппендикса. При иммуногистохимическом исследовании выявлено увеличение Ki 67-позитивных клеток, что указывает на увеличение пролиферативных процессов в структурах аппендикса и активацию адаптационно-приспособительных реакций на введенный антиген.

Ключевые слова: гранулярные люминесцирующие клетки, тучные клетки, катехоламины, серотонин.

© O. V. Vorob'yeva, 2017

Chuvash I. N. Ulyanov State University, Cheboksary, Russia

Pathomorphological and Immunohistochemical Study of the Appendix Structures after Allogeneic Transplantation of the Bone Marrow

Dynamics of changes of the appendix structures containing neuroamines after allogeneic transplantation of the bone marrow were studied. Increase in granular luminescent and mast cells with a numerical growth in the content of catecholamines and serotonin were observed in 40 minutes. In addition, there was an increase in serotonin index that indicates the controlling effect of serotonin over the processes of cell proliferation and differentiation of cellular forms in the layers of the appendix. Immunohistochemical study revealed an increase in Ki 67-positive cells, which indicates an increase in proliferative processes in the structures of the appendix and activation of adaptive reactions to injected antigen.

Key words: granular luminescent cells, mast cells, catecholamines, serotonin.

Введение

В организме человека имеется большое число нейроаминсодержащих структур, синтезирующих биогенные амины. Они паракринным воздействием влияют на пролиферацию, дифференцировку молодых клеток и функциональную активность зрелых, обладающих широким спектром биологических эффектов, оказывают регулирующее влияние на клетки и ткани [2, 5]. Гранулярные люминесцирующие клетки являются клетками быстрого реагирования на любые изменения концентрации нейроаминов в органах, способны быстро перестраивать свой ферментативный и инактивирующий обмен и влияют на созревание клеток [2, 3]. Тучные клетки воздействуют на метаболические процессы в организме при любых формах адаптации и патологических реакциях [5, 9]. Важной особенностью тучных клеток является разнонаправленное воздействие на один и тот же процесс, что определяется как многообразием медиаторов, так и особенностями их регуляторных свойств [7]. Поэтому изучение данных структур является

приоритетным направлением в области трансплантологии [8].

Цель исследования – изучение влияния аллотрансплантации костного мозга на нейроаминсодержащие клетки в структурах аппендикса.

Материал и методы исследования

Работа была выполнена на 60 белых мышцах-самцах массой 50–60 г, которые были разделены на три группы. Эксперимент проводили с разрешения локального этического комитета ФГБОУ ВПО «ЧГУ им. И. Н. Ульянова», с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ МЗ СССР №755 от 12.08.1977 г.) и «Правил лабораторной практики в Российской Федерации» (Приказ МЗ РФ от 19.06.2003 г. №267). 1-ю группу составили интактные особи (n=10); 2-ю группу – контрольные мыши (n=20), которым вводили 0.85% раствор NaCl в дозе 1 мл/кг массы. При введении данного раствора изменения в содержании и локализации

нейроаминов в структурах наблюдались до 30 мин. После 30 мин введения названные параметры уравнивались с таковыми у интактных мышей, картина препаратов была идентичной. В связи с этим, результаты исследования оценивали через 40 мин после аллотрансплантации костного мозга. Животным 3-й группы (n=30) внутривенно вводили суспензию костного мозга, полученную от мышей другой линии. Взятый из бедренной кости мыши линии SJL 0.1 мл костного мозга помещали в 1 мл 0.85% физиологический раствор NaCl и тщательно размешивали. Суспензию костного мозга вводили в хвостовую вену мыши линии BALB/c. Подсчет числа клеток в полученной суспензии костного мозга производили с помощью проточного спектрофотометра «Ф-2000». Число клеток в 1 мл суспензии находилось в пределах от 1.6×10^7 до 2.1×10^8 .

Под эфирным наркозом мышей выводили из эксперимента путем декапитации, извлекали аппендикс. В свежеприготовленных криостатных срезах толщиной 10 мкм методом Фалька–Хилларпа [8] выявляли катехоламины и серотонин. Цитофотометрию производили с помощью микроскопа Микромед-2 (ЛОМО, Россия) с об. 40, ок. 10, диаметром зонда 0.5 мм, с использованием флуориметрической насадки ФМЭЛ-1А (ЛОМО, Россия). Для оценки интенсивности свечения катехоламинов использовали светофильтр № 6 (длина волны – 480 нм); серотонина – № 8 (длина волны – 525 нм). В каждом срезе проводили не менее 20 измерений интенсивности свечения, выражая результаты в условных единицах люминесценции (усл. ед.) по шкале регистрирующего прибора усилителя. Количественное распределение гранулярных люминесцирующих и тучных клеток оценивали путем подсчета их в 5 полях зрения микроскопа Микромед-2 (ЛОМО, Россия) при увеличении об. 40, ок. 10, диаметре зонда 0.5 мм.

В структурах аппендикса дополнительно проводили определение пролиферативной активности клеток иммуногистохимическим методом, основанное на экспрессии ядерного белка Ki-67 пролиферирующими клетками [1]. Для выявления белка Ki-67 использовали моноклональные антитела к маркеру клеточной пролиферации Ki-67, клон ММ-1 (NovoCastra, Великобритания). Иммуногистохимические реакции для выявления Ki-67 осуществляли в соответствии со стандартными протоколами на базе патологоанатомического отделения БУ «Республиканский клинический онкологический диспансер» Минздравсоцразвития Чувашской Республики.

Извлекали аппендикс, фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина и после стандартной гистологической проводки заливали в парафин. Срезы аппендикса наносили на предметные стекла, обработанные

L-polysine, которые в течение суток высушивали при комнатной температуре. С использованием иммуногистохимических автостейнеров AUTOSTAINER-360 (THERMO, Великобритания) и Leica BOND-MAX (Германия) проводили окрашивание ручным и аппаратным способами. Блокаду эндогенной пероксидазы осуществляли охлажденным 3% раствором H_2O_2 на протяжении 10 мин. Для визуализации продуктов иммунной реакции использовали стрептавидин-биотиновый пероксидазный метод («Dako», LSAB+Kit, HRP), в качестве красящего соединения применяли раствор диаминобензидина («Dako», Ligid DAB+), докраску ядер осуществляли гематоксилином. Положительной экспрессией белка Ki-67 считалось наличие специфической коричневой окраски ядер клеток.

Цифровые фотографии микропрепаратов получены с применением системы архивирования на базе микроскопа Leica DM4000B с использованием цветной фотокамеры Leica DFC 425 и лицензионной программы Leica Application Suite 3.6.0. Фотографии для проведения программных морфометрических измерений были получены при увеличениях микроскопа $\times 400$ и $\times 900$.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью персонального компьютера, с использованием стандартного пакета программ. Различия определяли с помощью t-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

Результаты и их обсуждение

При обзорной люминесцентной микроскопии нейроаминсодержащих структур аппендикса опытных мышей через 40 мин после аллотрансплантации костного мозга выявлено неоднородное люминесцентное свечение, указывающее на различное содержание в них нейроаминов. Выявлено, что эпителий крипт аппендикса имеет желтую люминесценцию вследствие большого содержания в них гранулярных люминесцирующих, тучных клеток. Содержание катехоламинов и серотонина в них увеличено по сравнению с интактными мышами. В собственной пластинке слизистой оболочки и в подслизистой основе также выявляются гранулярные люминесцирующие клетки, часть из которых можно отнести к клеткам дисперсной эндокринной системы, способным синтезировать нейромедиаторные биогенные амины [3]. Число данных клеток увеличивается с повышенным содержанием в них катехоламинов и серотонина. Кроме этого, также увеличивается число тучных клеток, с повышенным содержанием в них нейроаминов.

В соединительной ткани слизистой оболочки крипт выявляются мелкие тучные клетки, численность которых увеличивается

Таблица 1

Содержание биогенных аминов в аппендиксе мышей в норме и через 40 мин после аллотрансплантации костного мозга (усл. ед.)

| Структуры | Интактные мыши | | Аллотрансплантация | |
|--|----------------|-----------|--------------------|-----------|
| | катехоламины | серотонин | катехоламины | Серотонин |
| слизистая оболочка | | | | |
| Гранулярные люминесцирующие клетки | 6.5±0.4 | 13.4±0.8 | 7.1±0.3 | 14.2±1.2 |
| Тучные клетки | 8.0±1.2 | 11.1±1.7 | 8.9±2.0 | 11.9±2.8 |
| Микроокружение | 4.4±0.6 | 6.5±0.8 | 7.3±1.0 | 13.1±2.4 |
| подслизистая основа | | | | |
| Тучные клетки лимфоидного узелка | 3.9±0.4 | 5.8±0.6 | 5.9±0.6 | 11.5±0.7 |
| Внутриузелковые гранулярные люминесцирующие клетки | 7.1±0.5 | 10.4±1.8 | 10.0±0.7 | 13.4±1.3 |
| Микроокружение внутриузелковых клеток | 2.7±0.3 | 4.6±0.5 | 3.0±0.2 | 6.4±0.5 |

Таблица 2

Серотониновый индекс и корреляционные пары нейроаминов в гранулярных люминесцирующих и тучных клетках лимфоидных узелков аппендикса после аллотрансплантации костного мозга

| Структуры | Корреляционные пары | Сроки после трансплантации | |
|------------------------------------|----------------------|----------------------------|--------|
| | | Интактные | 40 мин |
| Гранулярные люминесцирующие клетки | КА/СТ | 0.7* | 0.8* |
| | СТ/гистамин | 0.6 | -0.9# |
| | КА/гистамин | -0.44 | -0.8# |
| | Серотониновый индекс | 1.46 | 1.34 |
| Тучные клетки | КА/СТ | 0.7* | 0.7* |
| | СТ/гистамин | 0.43 | 0.9* |
| | КА/гистамин | -0.3 | -0.57 |
| | Серотониновый индекс | 1.49 | 1.45 |

Примечание: * – сильные положительные корреляционные взаимодействия; # – слабые корреляционные взаимодействия.

по сравнению с интактными мышами. В таких клетках возрастает содержание катехоламинов и серотонина, аналогичные изменения выявляются в гранулярных люминесцирующих клетках (табл. 1).

В подслизистой основе, в лимфоидных узелках отмечается повышенное число гранулярных люминесцирующих и тучных клеток. По краю лимфатического узелка прослеживается краевой синус, в котором обнаруживаются наиболее крупные гранулярные люминесцирующие клетки с наибольшей люминесценцией, т.е. с повышенным содержанием в них катехоламинов и серотонина.

Увеличилось содержание моноаминов в микроокружении этих клеток. Особенно много их адсорбируют эластические волокна. Увеличилась выявляемость адренергических нервных волокон вегетативной нервной системы.

Число внутриузелковых гранулярных люминесцирующих и тучных клеток увеличилось. Здесь гранулярные люминесцирующие клетки были крупнее, чем обычно, и располагались преимущественно по периферии центра размножения, имели желтую и зеленую люминесценцию.

Тучные клетки с высоким содержанием катехоламинов и серотонина обнаруживались

как и по периферии центра размножения, так и внутри него.

Таким образом, через 40 мин после аллотрансплантации костного мозга увеличивается число внутриузелковых гранулярных люминесцирующих и тучных клеток с одновременным увеличением в них биогенных аминов.

При анализе корреляционных связей в гранулярных люминесцирующих клетках лимфоидных узелков в паре катехоламины/серотонин образуются сильные корреляционные связи, что указывает на одновременный синтез данных нейроаминов в одну из фаз клеточного цикла и их взаимодействие. В паре серотонин/гистамин, а также катехоламинами и гистамином связь становится резко отрицательной, что указывает на то, что в межклеточное пространство выделяется один медиатор или в результате конкурентного вытеснения, или выделения этого медиатора в разные фазы клеточного цикла.

Во внутриузелковых тучных клетках наблюдается усиление связи между серотонином и гистамином с 0.43 до 0.9 (табл. 2).

Исследование серотонинового индекса показало, что как в гранулярных люминесцирующих, так и в тучных клетках данный показатель становится больше единицы. Это сви-

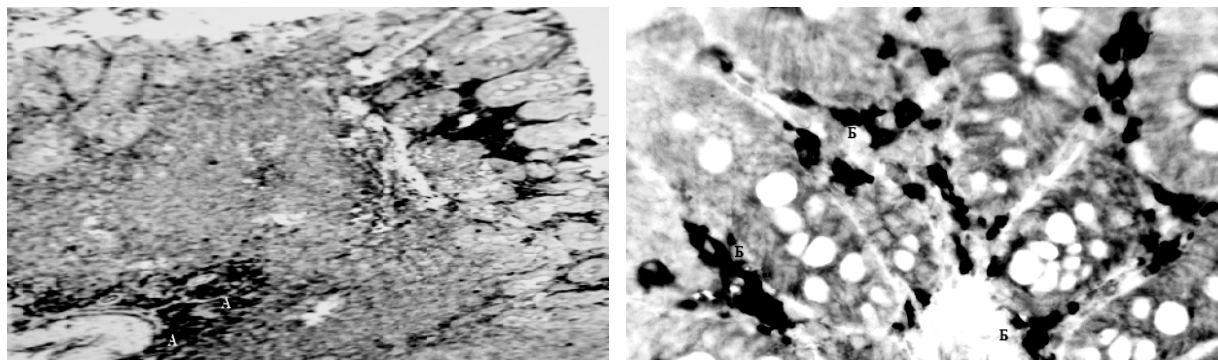


Рис. Аппендикс мышцы при аллотрансплантации костного мозга. 3-я опытная группа. Обозначения: А – Ki-67-позитивные тучные клетки (ув. 900); Б – Ki-67-позитивные гранулярные клетки. Иммуногистохимическая реакция на маркер Ki-67 (ув. 400).

детельствует, что все процессы пролиферации, дифференцировки клеточных форм в оболочках аппендикса осуществляется под воздействием серотонина.

При иммуногистохимической реакции отмечается увеличение числа Ki-67-позитивных клеток по сравнению с интактными мышцами. Число тучных клеток, экспрессирующих белок Ki-67 достигает 4 (у интактных – 2), гранулярных – 5 на одно поле зрения (у интактных – 4) (рис.).

Большинство клеток располагается в межлимфоидном пространстве, где число тучных клеток достигает 50 (у интактных – 20), а гранулярных – 25 (у интактных – 10–12). Увеличивается число лимфоцитов. Выявляются два вида лимфоцитов: с усиленной экспрессией белка Ki-67, темной окраской ядра и слабой экспрессией, а также светлой окраской ядра, что указывает на развитие специфической реакции на антигенное воздействие. Группы клеток, имеющие резко положительную реакцию на данный маркер, определяются в паракортикальной зоне, что указывает на активацию Т-лимфоцитов, тучных и гранулярных клеток (рис.).

Выводы

Анализируя полученные данные можно заключить, что через 40 мин после аллогенной пересадки костного мозга выявляется численное увеличение нейроаминсодержащих структур аппендикса с преимущественным преобладанием данных структур в подслизистой основе, где клетки были несколько крупнее. Кроме того, они выявлялись с повышенным содержанием нейроаминов (серотонина и катехоламинов). Как известно, свободный серотонин оказывает многофакторное воздействие, влияет на конечное звено дифференцировки молодых клеток [4]. Возрастающий уровень серотонина в структурах аппендикса после аллотрансплантации костного мозга, возможно, указывает на стимулирующее влияние серотонина на дифференцировку клеток. При исследовании содержания ка-

техоламинов в структурах аппендикса было выявлено их аналогичное численное увеличение. Катехоламины с серотонином совместно влияют на дифференцировку и пролиферацию клеток [4]. Значение серотонинового индекса более единицы указывает на то, что все процессы в оболочках аппендикса осуществляются под воздействием серотонина. При анализе иммуногистохимических реакций выявлено усиление пролиферативной активности клеток и активация Т-системы лимфоцитов.

Таким образом, аллогенная пересадка костного мозга через 40 мин способствует увеличению нейроаминсодержащих структур, с повышенным синтезом нейроаминов. Через 40 мин после пересадки костного мозга происходит активация адаптационно-приспособительных процессов в структурах аппендикса, при котором увеличивается содержание нейроаминов. На фоне данных изменений, возможно, сохраняется нормальная функциональная активность структур аппендикса.

Список литературы

1. Авцын А. П. Принципы и методы гистоцитохимического анализа в патологии / А. П. Авцын, А. И. Струков, Б. Б. Фукс. 1971. Л.: изд-во «Медицина». 368 с.
2. Воробьева О. В. Нейромедиаторные биогенные амины в структурах костного мозга при аллопересадке / О. В. Воробьева // Морфологические ведомости. 2016. Т. 24, № 4. С. 89–92.
3. Любовцева Л. А. Люминесцентно-гистохимическое исследование аминоксодержащих структур костного мозга, тимуса и крови при действии нейромедиаторов и антигенов / Л. А. Любовцева. Чебоксары: изд-во Чуваш. ун-та, 1993. 100 с.
4. Ставинская О. А. Роль гистамина и серотонина в поддержании иммунного гомеостаза / О. А. Ставинская // Российский аллергологический журнал. 2008. № 1. С. 283–284.
5. Яглова Н. В. Биология секреции тучных клеток / Н. В. Яглова, В. В. Яглов // Клиническая и экспериментальная морфология. 2012. № 4. С. 4–9.

6. Haematopoietic stem cell participate in muscle regeneration / M. Abedi [et al.] // Br. J. Haematol. 2007. Vol. 138. № 6. P. 792–801.
7. Boyce J. A. The biology of the mast cell / J. A. Boyce // Allergy and Asthma Proc. 2004. Vol. 25. № 1. P. 27–30.
8. 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.
9. Kovanen P. T. Mast cells in atherogenesis: actions and reactions / P. T. Kovanen // Curr. Atheroscler. Rep. 2009. Vol. 11, № 3. P. 214–219.

Сведения об авторе

Воробьева Ольга Васильевна – канд. мед. наук, доцент кафедры общей и клинической морфологии и судебной медицины ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н.Ульянова». 428000, Чувашская Республика, г. Чебоксары, Московский пр-т, 45. E-mail: olavorobeva@mail.ru

Поступила в редакцию 11.10.2016 г.