

УДК [599.323.4-114.4:616-089.843]^591/434/2
© О. В. Воробьева, 2017
<https://doi.org/10.18499/2225-7357-2017-6-2-26-29>

ДИНАМИКА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ КЛЕТОЧНЫХ ДИФФЕРОНОВ КОСТНОГО МОЗГА КАК ОРГАНА КРОВЕТВОРЕНИЯ

О. В. Воробьева

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

Цель исследования – изучить влияние аутотрансплантации костного мозга на его клеточные диффероны.

Материал и методы. Работа выполнена на 40 белых мышках-самцах линии SJL. 1-ю группу составили интактные мыши (n=20). Особям 2-й группы (n=20) в хвостовую вену вводили суспензию костного мозга, взятого из бедренной кости того же животного. Животных выводили из эксперимента через 40 мин и 2 ч путем декапитации. Тучные клетки подсчитывали в 5 полях зрения микроскопа. Люминесцентно-гистохимический метод S. A. Cross, S. W. Even, F. W. Rost использовали для выявления тканевого гистамина. С помощью окраски по А. Унна изучали степень сульфатированности гепарина и состояние тучных клеток. Миелограмму рассчитывали на 500 клеток после окраски препаратов по Паппенгейму. Иммуногистохимически выявляли Ki-67 моноклональными антителами, клон MM-1 (NovoCastra, Великобритания) в соответствии со стандартными протоколами. В работе использовались методы описательной статистики. Различия определяли с помощью t-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

Результаты. Отмечается увеличение числа тучных клеток, с повышенным содержанием гистамина. Наблюдается увеличение активности иммунных процессов на фоне усиленной люминесценции лимфоцитов и повышения митотической активности клеток. Увеличивается численность молодых тучных клеток, окрашенных β -метахроматично. При иммуногистохимической реакции на Ki-67 выявляются делящиеся клетки.

Выводы. Аутогенная пересадка костного мозга способствует интенсификации иммунных и пролиферативных процессов в структурах костного мозга мышей, а также приводит к образованию молодых тучных клеток. Уменьшение сульфатации гепарина в тучных клетках приводит к либеризации гистамина и изменению миелограммы.

Ключевые слова: костный мозг, аутотрансплантация, тучные клетки, гистамин, пролиферация.

© O. V. Vorob'eva, 2017

Chuvash I.N. Ulyanov State University

Dynamics of the Morphofunctional State of Bone Marrow Cell-Differons as a Hematopoietic Organ

The aim of the study is to evaluate the effect of bone marrow autotransplantation on its cell-differons.

Material and methods. The study was performed on 40 white SJL male mice. In the 1st group there were 20 intact mice. Animals of the 2nd group (n=20) were injected with suspension of bone marrow taken from the femur of the same animal, in the caudal vein. The animals were removed from the experiment at 40 min and 2 h by decapitation. Mast cells were counted in 5 fields of view of the microscope. S. A. Cross, S. W. Even, F. W. Rost luminescent-histochemical method was used for tissue histamine detection. The degree of heparin sulphation and the state of mast cells were studied by A. Unna staining. Myelogram was counted in 500 cells after Pappenheim staining. Ki-67 was detected by MM-1 antibodies (NovoCastra, GB) according to standard protocols. For two group comparisons, Student's t-test was used. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results. There is an increase in the number of mast cells, with an increased content of histamine. An increase in immune processes activity on the background of enhanced luminescence of lymphocytes and increase of cells mitotic activity. The number of young β -metachromatic mast cells is increasing. Ki-67 immunohistochemical staining revealed proliferating cells.

Conclusions. Autogenous bone marrow transplantation promotes intensification of immune and proliferative processes in bone marrow structures of mice and also leads to the formation of young mast cells. Reduction of heparin sulfation in mast cells leads to histamine liberation and myelogram changes.

Key words: bone marrow, autotransplantation, mast cells, histamine, proliferation.

Введение

В последние годы перспективным направлением является изучение клеточного состава костного мозга, а также тучных клеток (ТК), участвующих в любых адаптивных реакциях и патологических процессах. Данные клетки имеют гетерогенную внутреннюю структуру. Ключевым компонентом гранул ТК является гепарин, оказывающий влияние как модулятор активности ферментов и клеток, направленное на поддержание гомеостаза [5].

Большинство исследователей отводят данному компоненту ТК локальную роль в поддержании реологических свойств крови, модуляции клеточных ответов при иммунных процессах, клеточной пролиферации, миграции клеток [3, 8, 9]. Кроме того, в гранулах ТК содержится большое количество гистамина, связанного с белками, входящими в состав гранулярного матрикса [1, 2, 6], что определяет характерную метахроматическую окраску гранул. Однако в доступной литературе недостаточно освещен вопрос о клеточном составе

костного мозга после аутооттрансплантации [2, 3].

Цель исследования – изучение влияния аутооттрансплантации костного мозга на его клеточные дифференсы.

Материал и методы исследования

Работа была выполнена на 40 белых мышках-самцах линии SJL, массой 50–60 г, разделенных на 2 группы. 1-ю группу составили интактные мыши (n=20), 2-ю группу – особи, которым выполняли аутооттрансплантацию костного мозга (n=20). Животных выводили из эксперимента через 40 мин и 2 часа путем декапитации. Взятый из бедренной кости мышши 0.1 мл костного мозга помещали в 1.0 мл 0.85% физиологического раствора NaCl и тщательно размешивали. Суспензию костного мозга вводили в хвостовую вену этой же мышши. Подсчет числа клеток в полученной суспензии костного мозга проводили 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 .

Эксперимент проводился 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). Изучение количественного распределения ТК проводили путем их подсчета в 5 полях зрения микроскопа Люмам-6 (ЛЮМО, Россия) при об. 40, ок. 10, диаметре зонда 0.5 мм. Люминесцентно-гистохимический метод S. A. Cross, S. W. Even, F. W. Rost [7] использовали для выявления тканевого гистамина. С помощью окраски по А. Унна изучали степень сульфатированности (созревания) гепарина и состояния ТК. Ортохромную (голубую) окраску дает моно- и дисульфатированный, незрелый гепарин; бета-метахроматическую (чернильно-фиолетовую) – трехсульфатированный, созревающий гепарин и гамма-метахроматическую (пурпурную) – зрелый, пентисульфатированный гепарину. Миелограмму рассчитывали на 500 клеток после окраски препаратов по Паппенгейму. Иммуногистохимический метод использовали для выявления пролиферации клеток, экспрессирующих маркеры Ki-67 в костном мозге. Для определения белка Ki-67 применяли моноклональные антитела к маркеру клеточной пролиферации Ki-67, клон MM-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. Статистическую об-

работку 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 исследовании костного мозга через 40 мин после аутопересадки выявляются люминесцирующие ТК с большим содержанием гистамина до 34.3 ± 0.2 у.е. (у интактных животных – 31.6 ± 0.3 у.е.). Определяется диффузное свечение гистамина в гемопоэтических клетках, в которых светятся, в основном, ядра клеток, за исключением бластных форм, у которых люминесцируют периферические части цитоплазмы. Межклеточное вещество светится ярче клеток. Большое содержание гистамина определяется в цитоплазме базофильных мегакариоцитов. Около островков размножения располагаются нервные волокна, вблизи которых находятся ТК. Определяются лимфоциты с ярко люминесцирующими и тусклыми ядрами. Кроме того, у юных и палочкоядерных нейтрофилов начинают слабо люминесцировать ядра. Остальные гемопоэтические клетки люминесцируют слабо.

При окраске препаратов костного мозга по А. Унна через 40 мин большинство гемопоэтических клеток костного мозга дают одинаковую ортохромную окраску, происходит небольшое уменьшение сульфатации гепарина, за исключением клеток эозинофильного ряда, где в цитоплазме выявляется легкая метахроматизация.

ТК окрашиваются β -метахроматично. Согласно их морфологическим признакам различают три разновидности: одни – мелкие, с голубыми, ассиметрично расположенными ядрами, другие – овальные с центрально расположенным ядром, третьи – дегранулированные вплоть до тотального распада.

Через 2 ч после аутопересадки в костном мозге ТК определяются более мелких размеров, по сравнению с таковыми у интактных мышши, что можно расценивать как образование молодых ТК. Содержание гистамина в ТК продолжает увеличиваться и достигает 38.3 ± 0.2 у.е. При окраске по А. Унна выявляются β -метахроматичные клетки, с синим, ассиметрично расположенным ортохромным ядром.

При исследовании клеточного состава костного мозга через 40 мин после аутопересадки выявляются преимущественно митотически делящиеся лимфоциты. В миелограмме увеличивается как число лимфоцитов, так и бластных форм клеток (табл.). Отмечается значительное преобладание числа сегментоядерных нейтрофилов, а также клеток эозинофильного ряда.

Миелограмма мышей после аутопересадки костного мозга (M±m)

Изучаемые структуры	Интактные особи	Аутопересадка	
		40 мин	2 ч
Эритроидный ряд	28.7±0.1	28.7±0.1	28.7±0.1
Миелобласты	2.1±0.1	2.6±0.1	3.2±0.1
Промиелоциты	1.5±0.1	1.7±0.1	1.9±0.1
Метамиелоциты эозинофильные	5.2±0.1	2.9±0.1	2.6±0.1
Сегментоядерные эозинофилы	3.6±0.1	3.8±0.1	4.1±0.1
Метамиелоциты нейтрофильные	3.5±0.1	1.7±0.1	1.4±0.1
Палочкоядерные нейтрофилы	8.5±0.2	6.0±0.1	5.4±0.1
Сегментоядерные нейтрофилы	18.2± 0.8	32.2±0.3	35.1±0.3
Лимфоциты	11.1±0.1	13.8±0.1	15.2±0.2
Мегакариоциты	0.7±0.1	0.8±0.1	1.2±0.1
Бласты	3.4±0.83	5.2±0.83	6.3±0.8

Примечание: из расчета на 500 клеток.

При изучении клеточного состава костного мозга через 2 ч отмечается увеличение числа лимфобластов и лимфоцитов, наряду с уменьшением численности клеток эозинофильного ряда, плазмоцитов и плазмобластов.

При введении собственного костного мозга усиливается митотическая активность клеток, начиная с миелобластов.

При иммуногистохимическом выявлении ядерного антигена Ki 67 отмечается его экспрессия в ТК. Выявлены два вида сегментоядерных нейтрофилов: с максимальной экспрессией белка, т.е. ярко окрашенные и минимальной экспрессией – т.е. со светлым ядром. Мегакариоциты изучаемый белок экспрессируют слабо. Число позитивно окрашенных лимфоцитов достигает 16 клеток в поле зрения. Определяются митотически делящиеся клетки.

Исходя из полученных данных, можно заключить, что аутопересадка приводит к структурным изменениям в костном мозге. Начиная с ранних сроков и до 2 ч происходит интенсификация иммунных процессов и дифференцировка клеток костного мозга, вследствие чего происходит увеличение содержания гистамина в ТК. Определяются лимфоциты с ярко люминесцирующими и тусклыми ядрами, по данным Л. А. Любовцевой [4], происходит образование как Т-, так и В-лимфоцитов. У юных и палочкоядерных нейтрофилов начинают слабо люминесцировать ядра. Вероятно это указывает на активацию иммунной реакции. Кроме того, усиливается митотическая активность клеток, начиная с миелобластов, т.е. активируется гетеропластическое кроветворение.

Определяются молодые ТК, содержание которых в костном мозге увеличивается. В ответ на антигенные стимулы, содержимое гранул ТК поступает в межклеточное пространство путем апокринового и мерокриновое типов секреции: дегрануляции (выхода гранул) и гранулолизиса (секреции содержимого гранул). Полностью дегранулированные клетки через некоторое время восстанавливают пул медиаторов [4]. Кроме того, ТК ок-

рашиваются β-метахроматично, однако отмечается небольшое уменьшение сульфатации гепарина, который способствует выделению гистамина и изменению миелограммы, что указывает на участие гепарина ТК в регуляции гемостаза [5]. При иммуногистохимической реакции выявляются митотически делящиеся клетки. Отмечается увеличение числа нейтрофилов в костном мозге, участвующих в межклеточных кооперациях с осуществлением регуляторных влияний на функции клеток различных популяций.

Выводы

1. Аутогенная пересадка костного мозга способствует образованию молодых тучных клеток.
2. Выявляется β-метахроматичная окраска тучных клеток, небольшое уменьшение сульфатации гепарина, который способствует выделению гистамина и изменению миелограммы в клетках костного мозга.
3. Отмечается интенсификация иммунных процессов на фоне увеличенной люминесценции лимфоцитов, усиления митотической активности клеток.
4. При иммуногистохимическом исследовании выявляются делящиеся клетки и увеличение пролиферативных процессов в костном мозге.

Список литературы

1. Бережная Н. М., Сепиашвили Р. И. Тучные клетки и гистамин: физиологическая роль аутоадренорецепторов. Аллергология и иммунология. 2003; 3: 29–38.
2. Воробьева О. В. Нейроамины – регуляторы местных процессов при аутопересадке костного мозга. Саратовский научно-медицинский журнал. 2015; 4: 524–526.
3. Воробьева О. В. Особенности нейроаминного фона при аутоаутопересадки костного мозга. Современные проблемы науки и образования. 2015; 5: 60.
4. Любовцева Л. А. Люминесцентно-гистохимическое исследование аминокислотосодержащих струк-

- тур костного мозга, тимуса и крови при действии нейромедиаторов и антигенов. Чебоксары: изд-во Чуваш. ун-та; 1993. 100.
5. Моренко Г. С. Проницаемость гепарина через мембраны эритроцитов. II съезд фармацевтов Казахской ССР. Чикмент; 1981: 406–407.
 6. Azuma Y., Shinohara M., Wang P. Histamine inhibits chemotaxis, phagocytosis, superoxide anion production, and the production of TNF α , and IL 12 by macrophage via H2 receptors. *Int. Immunopharmacol.* 2001; 9: 1867–1875.
 7. Cross S. A. M., Ewen S. W. B., Rost E. W. D. A study of the methods available for the cytochemical localization of histamine by fluorescence induced with o-phthalaldehyde or acetaldehyde. *Histochem. J.* 1971; 6: 471–476.
 8. Hauner H. Secretory factors from human adipose tissue and their functional role. *Proc. Nutr. Soc.* 2005; 64(2): 163–169.
 9. Khalil M., Ronda J., Weinraub M., et al. Brain mast cell relationship to neurovasculature during development. *Brain Res.* 2007; 1171: 18–29.
- References**
1. Berezhnaya N.M., Sepiashvili R.I. Tuchnye kletki i gistamin: fiziologicheskaya rol' autoadrenoretseptorov [Mast cells and histamine: physiological role of autoaggregation]. *Allergology and Immunology.* 2003; 3: 29–38 (in Russian).
 2. Vorob'eva O.V. Neyroaminy – regulatory mestnykh protsessov pri autoperesadke kostnogo mozga [Neuroamines – regulators of local processes at bone marrow autotransplantation]. *Saratov Journal of Medical Scientific Research.* 2015; 4: 524–526 (in Russian).
 3. Vorob'eva O.V. Osobennosti neyroaminnogo fona pri autotransplantatsii kostnogo mozga [Features neyroaminnogo background when autologous bone marrow transplantation]. *Modern problems of science and education.* 2015; 5: 60 (in Russian).
 4. Lyubovtseva L.A. Lyuminestsentno-gistokhimicheskoe issledovanie aminosoderzhashchikh struktur kostnogo mozga, timusa i krovi pri deystvii neyromediatorov i antigenov [Luminescent-histochemical study of the amine-containing structures of the bone marrow, thymus and blood under the action of neurotransmitters and antigens]. *Cheboksary: publishing house of the Chuvash. University press; 1993. 100 (in Russian).*
 5. Morenko G.S. Pronitsaemost' geparina cherez membrany eritrotsitov [The permeability of heparin through the membrane of red blood cells]. II Congress of pharmacists of the Kazakh SSR. *Chikment; 1981: 406–407 (in Russian).*
 6. Azuma Y., Shinohara M., Wang P. Histamine inhibits chemotaxis, phagocytosis, superoxide anion production, and the production of TNF α , and IL 12 by macrophage via H2 receptors. *Int. Immunopharmacol.* 2001; 9: 1867–1875.
 7. Cross S. A. M., Ewen S. W. B., Rost E. W. D. A study of the methods available for the cytochemical localization of histamine by fluorescence induced with o-phthalaldehyde or acetaldehyde. *Histochem. J.* 1971; 6: 471–476.
 8. Hauner H. Secretory factors from human adipose tissue and their functional role. *Proc. Nutr. Soc.* 2005; 64(2): 163–169.
 9. Khalil M., Ronda J., Weinraub M., et al. Brain mast cell relationship to neurovasculature during development. *Brain Res.* 2007; 1171: 18–29.
- Сведения об авторах**
- 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, 15. Email: olavogrobeva@mail.ru
- Поступила в редакцию 16.12.2016 г.