

© О. В. Воробьева, 2016
УДК 611.346.2:616.71-018.46-089.844:599.323.4

О. В. Воробьева

ИЗМЕНЕНИЕ СТРУКТУР ЧЕРВЕОБРАЗНОГО ОТРОСТКА, СОДЕРЖАЩИХ БИОГЕННЫЕ АМИНЫ, ПОСЛЕ АУТОТРАНСПЛАНТАЦИИ КОСТНОГО МОЗГА

Кафедра общей и клинической морфологии и судебной медицины (зав. — проф. Л. А. Любовева),
ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный университет им. И. Н. Ульянова», г. Чебоксары

На мышцах-самках ($n=90$) с использованием гистологических, гистохимических и морфометрических методов изучено влияние аутопересадки костного мозга на нейроаминный обмен в структурах червеобразного отростка (ЧО) во временном аспекте. Исследование показало, что аутопересадка костного мозга через 40 мин приводит к увеличению числа клеток, продуцирующих биогенные амины, а в них через 2 ч — к возрастанию содержания нейроаминов на фоне повышения митотической активности лимфоцитов в центрах размножения лимфоидных узелков. Отмечено образование новых центров размножения, окруженных гранулярными люминесцирующими и тучными клетками.

Ключевые слова: тучные клетки, гранулярные люминесцирующие клетки, червеобразный отросток, трансплантация

Трансплантация костного мозга — метод лечения тяжелых гематологических, онкологических и некоторых неопухолевых заболеваний, при котором больному после эрадикации (уничтожения) костномозгового кроветворения в результате воздействия сверхвысоких доз цитостатиков и лучевой терапии вводится собственный костный мозг (аутотрансплантация), взятый до начала химио- и лучевой терапии. Это позволяет за короткий срок восстановить иммунную и кроветворную системы больного [2, 5].

По данным литературы [3], начиная с определенных доз радиации, костный мозг погибает. Однако некоторые кроветворные органы продолжают функционировать, чаще всего это червеобразный отросток (ЧО). В этих случаях, пытаясь спасти пациента, ему пересаживают родственный костный мозг, который не всегда приживается. Можно предположить, что лимфоидные клетки можно взять из своего собственного организма, например, из ЧО, в связи с чем необходимо выяснить, какие изменения в нем происходят на уровне одного из пусковых механизмов кроветворения — биогенных аминов (БА).

По данным многих исследователей [3, 4], основными клетками, содержащими БА, такие как гистамин, катехоламины (КА) и серотонин (СТ), считаются тучные клетки (ТК) и гранулярные люминесцирующие клетки (ГЛК), тесно связанные с автономной нервной системой, ее адренергическим и парасимпатическим звеном

[4]. К ГЛК относят АПУД-клетки, имеющие гранулы разной величины с неодинаковым содержанием синапсов, и многоотростчатые дендритные макрофаги с мелкими гранулами одного цвета и не люминесцирующим ядром [4]. Эти структуры являются местными регуляторами процессов, происходящих в кроветворных органах.

Целью данного исследования явилось изучение влияния аутотрансплантации костного мозга на нейроамины в структурах ЧО.

Материал и методы. Работа выполнена на 90 белых мышцах-самках массой 50–60 г. Все процедуры и уход за животными осуществляли 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 г. № 267). Мыши были разделены на 3 группы: 1-я группа — интактные мыши; 2-я группа — контрольные животные, которым вводили 0,85% раствор NaCl в дозе 1 мл/кг массы. Животным 3-й группы внутривенно вводили их собственный костный мозг, взятый из бедренной кости, при этом 0,1 мл костного мозга помещали в 1 мл 0,85% раствора NaCl и тщательно размешивали. Суспензию костного мозга вводили в хвостовую вену [12]. В полученной гетерогенной популяции костного мозга с помощью проточного спектрофотометра RB2201 (Солар, Белоруссия) с применением флюоресцеина изотиоцианата (FITC) подсчитывали число клеток, в 1 мл суспензии их было от $1,6 \times 10^7$ до $2,1 \times 10^8$.

ЧО извлекали под местной анестезией через 40 мин и 2 ч от начала опыта, фиксировали в 10% нейтральном формалине и заключали в парафин по стандартной методике. Гистологические поперечные срезы ЧО толщиной 15 мкм

Сведения об авторах:

Воробьева Ольга Васильевна (e-mail: olavorobeva@mail.ru), кафедра общей и клинической морфологии и судебной медицины, Чувашский государственный университет им. И. Н. Ульянова, 428015, Чувашская Республика, г. Чебоксары, Московский пр., 15

окрашивали гематоксилином — эозином и изучали с помощью микроскопа Биомед-1 (ЛОМО, Россия). При иммерсионном увеличении в лимфоидных узелках определяли фигуры митоза.

В свежеприготовленных криостатных срезах толщиной 10 мкм методом S.A.Cross и соавт. [10] выявляли тканевый гистамин, а методом Фалька—Хилларпа [11] — КА и СТ. Цитоспектрофлюориметрию проводили с помощью микроскопа Микромед-2 (ЛОМО, Россия) при об. 40, ок. 10, диаметр зонда 0,5 мм, с использованием флуориметрической насадки ФМЭЛ-1А (ЛОМО, Россия). Интенсивность свечения представляли в единицах флуоресценции — усл. ед. Концентрацию гистамина измеряли при интерференционном фильтре N7 (длина волны 515 нм), КА — N6 (480 нм), СТ — N8 (525 нм). ГЛК и ТК подсчитывали в 5 полях зрения микроскопа Микромед-2 (ЛОМО, Россия) при об. 40, ок. 10 и диаметре зонда 0,5 мм и определяли их среднее количество в одном поле зрения.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием стандартного пакета программ. Различия определяли по t-критерию Стьюдента и считали значимыми при $P < 0,005$.

Результаты исследования. Данные, полученные при исследовании ЧО у интактных мышей и животных после введения изотонического раствора хлорида натрия через 40 мин и 2 ч от начала эксперимента, не различались. При микроскопическом исследовании стенка ЧО у интактных мышей имела обычную структуру. В эпителии крипт выявлялись единичные клетки, окруженные адренергическими нервными волокнами, обладающими яркой люминесценцией (рисунк, а). Данные клетки имели большое содержание как КА, так и СТ.

В собственной пластинке слизистой оболочки ЧО выявлялась люминесценция волокон, образующих густую узкопетлистую сеть. В подслизистой основе были обнаружены лимфоидные узелки, в которых располагались ГЛК. Наибольшее скопление данных клеток наблюдалось в центрах размножения узелков и меньшее их число — по периферии (см. рисунок, б). В зависимости от уровня среза их выявлялось от 47 до 89. Между лимфоидными узелками находились густо расположенные адренергические нервные волокна.

В мышечной оболочке, рыхлой волокнистой соединительной ткани между пучками гладких миоцитов располагались единичные адренергические нервные волокна, подходящие к ТК.

При выявлении содержания гистамина было обнаружено, что эпителий крипт имел слабую люминесценцию. Между эпителиальными клетками определялись редко расположенные гистаминсодержащие энтерохромаффинные клетки (относящиеся к ECL-клеткам) (см. рисунок, в), число которых достигало от 1 до 4 в поле зрения (при ув. 400). Между криптами, в собственной пластинке слизистой оболочки выявлялись люми-

несцирующие ТК. В подслизистой основе в лимфоидных узелках было меньше гистаминсодержащих ГЛК, чем моноаминсодержащих клеток. В центрах размножения лимфоидных узелков ГЛК было значительно больше, чем по периферии узелков.

Таким образом, в ЧО у интактных мышей наибольшее содержание КА определялось в ТК, а максимальное содержание СТ и гистамина — в ГЛК. Между лимфоидными узелками имела густая сеть адренергических нервных волокон.

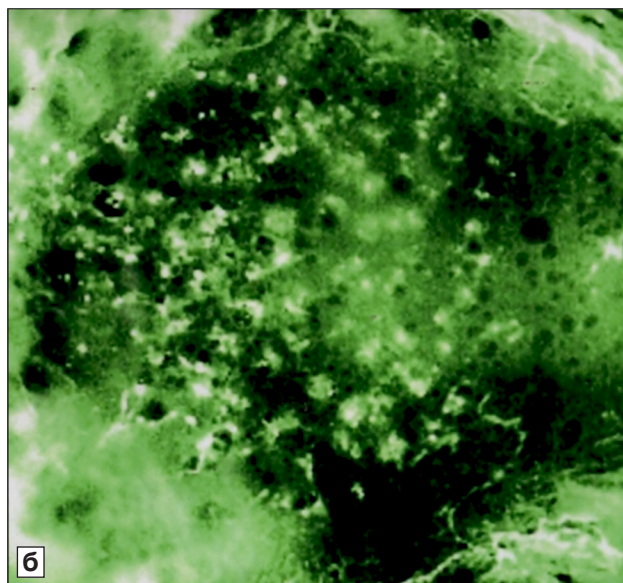
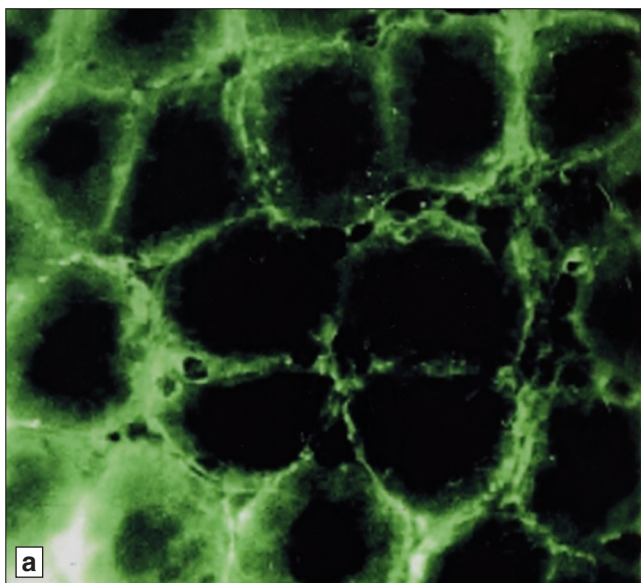
При микроскопическом исследовании срезов ЧО через 40 мин после введения собственного костного мозга наблюдалось изменение формы лимфоидных узелков с центрально расположенными макрофагами. Через 2 ч увеличилась митотическая активность лимфоцитов в центре размножения лимфоидных узелков и появились малые лимфоциты с темноокрашенным ядром и лимфоциты со светлой цитоплазмой и ядром. Кроме того, через 40 мин число ГЛК как в слизистой оболочке, так и в подслизистой основе имело тенденцию к увеличению по сравнению с таковым у интактных мышей (на $2,0 \pm 0,3$ ед.). Однако в ГЛК собственной пластинки слизистой оболочки содержание КА и СТ повысилось до $6,8 \pm 0,3$ и $13,8 \pm 0,4$ усл. ед. соответственно при норме $5,10 \pm 0,10$ и $10,0 \pm 0,20$ усл. ед.

В лимфоидных узелках произошло значимое увеличение числа люминесцирующих ТК до $8,1 \pm 0,7$ при норме $5,2 \pm 0,6$ и люминесцирующих ГЛК до $14,1 \pm 1,1$ при норме $11,4 \pm 1,1$. Содержание КА в них составило $4,9 \pm 0,5$, а СТ — $6,2 \pm 0,5$ при $3,9 \pm 0,4$ и $5,8 \pm 0,6$ усл. ед. соответственно по сравнению с таковым у интактных животных.

Через 2 ч число люминесцирующих клеток не изменилось, а содержание моноаминов в них увеличилось в 1,3 раза.

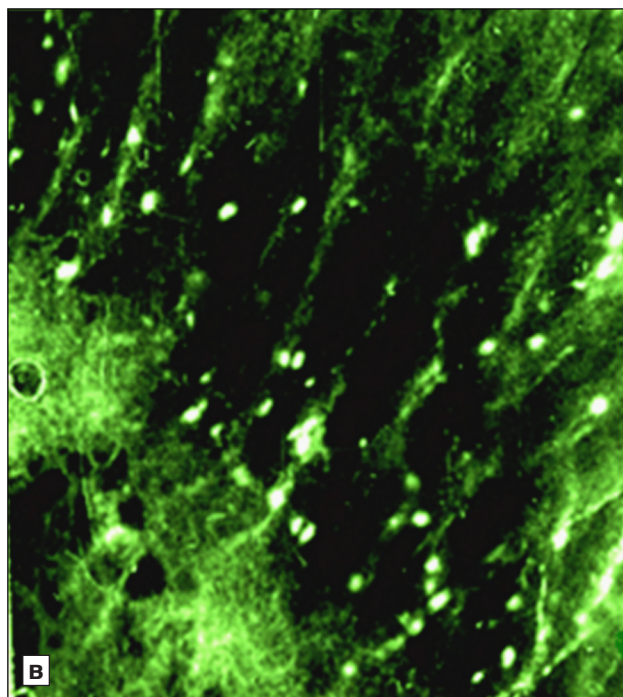
Через 40 мин в собственной пластинке слизистой оболочки отмечалось увеличение числа ТК до $12,9 \pm 1,2$ при норме $8,0 \pm 1,2$, однако содержание гистамина в них уменьшилось до $18,1 \pm 1,6$ при норме $21,2 \pm 0,3$ усл. ед. ($P < 0,05$). Часть ТК подверглись дегрануляции. Через 2 ч выявлялись мелкие клетки со сниженным содержанием гистамина в 2 раза по сравнению с таковым у интактных животных. Около отдельных люминесцирующих групп лимфоцитов появлялась прерывистая цепочка из ГЛК и ТК.

В лимфоидных узелках через 40 мин отмечалось значимое увеличение числа ТК с $5,6 \pm 0,3$ до $7,2 \pm 0,3$, но в них происходило снижение содержания гистамина до $7,20 \pm 0,20$ от $13,40 \pm 0,20$ усл. ед. ($P < 0,05$) у интактных животных. В лимфоидных узелках увеличивалось число ГЛК до $3,5 \pm 0,9$ при



Червеобразный отросток intactной мыши.

а — адренергические нервные волокна около крипт; б — адренергические нервные волокна около лимфоидных узлов в подслизистой основе; в центре размножения находятся гранулярные люминесцирующие клетки; в — энтерохромаффинные клетки в эпителии крипт. Метод Фалька—Хилларпа. Ув.200



норме $2,0 \pm 0,9$ усл. ед. Содержание в них гистамина значительно снизилось до $8,3 \pm 0,6$ при норме $16,2 \pm 0,7$ усл. ед. Через 2 ч число люминесцирующих диаминсодержащих ГЛК имело тенденцию к увеличению, но содержание гистамина не изменилось. В коронковой части лимфоидных узлов происходило образование новых центров размножения.

Мышечная оболочка имела довольно слабую люминесценцию, что указывало на небольшое содержание гистамина. Число ТК увеличилось незначительно, преимущественно они располагались в соединительной ткани, между мышечными слоями.

Обсуждение полученных данных. При исследовании выявлено, что через 40 мин после аутотрансплантации костного мозга появились центры размножения в лимфоидных узлах ЧО, увеличилось число клеток, продуцирующих БА. К функционально активным структурам ЧО относятся ГЛК и ТК [1, 9], накапливающие в секреторных гранулах большое количество медиаторов. Возможно, благодаря секреции разнонаправленных по действию нейромедиаторов, ТК участвуют в поддержании обмена БА в структурах ЧО. Аутопересадка костного мозга увеличивает как число этих клеток, так и содержание нейромедиаторов в них. Одни группы лимфоцитов имеют яркую люминесценцию, у других — люминесценция отсутствует. Однако в том и другом

случае вокруг них образуются цепочки из ГЛК и ТК, которые способствуют повышению функциональной активности клеток в структурах ЧО.

Через 2 ч в ЧО увеличилась митотическая активность лимфоцитов как в центрах размножения лимфоидных узлов, так и в их коронковых зонах. Имеются данные [4, 6, 7], что нейромедиаторы ответственны как за митотическую активность клеток (гистамин и СТ), так и за их дифференцировку (СТ). Появляются малые лимфоциты с темноокрашенным ядром и светлые лимфоциты со светлоокрашенными цитоплазмой и сферическим ядром, занимающим почти всю клетку. Очевидно, эти лимфоциты имеют разную функциональную направленность. Можно предположить, что это

Т- и В-лимфоциты, тем более что ранее были получены сходные данные [3].

В лимфоидных узелках подслизистой основы через 2 ч число моноаминсодержащих люминесцирующих клеток не изменилось, а содержание моноаминов в них увеличилось в 1,3 раза. Содержание СТ через 2 ч в ГЛК возросло в 1,5 раза.

В собственной пластинке слизистой оболочки между криптами обнаружались мелкие компактные ТК с в 2 раза сниженным содержанием гистамина по сравнению с таковым у интактных животных. Очевидно, наблюдалось образование молодых ТК. В лимфоидных узелках число люминесцирующих диаминсодержащих ГЛК имело тенденцию к увеличению, но содержание гистамина в них не изменилось. Вполне возможно, что это способствовало образованию новых центров размножения в коронковой части лимфоидных узелков. Образование новых центров размножения сопровождалось появлением около них ГЛК и ТК.

Обнаружено, что при аутотрансплантации костного мозга ГЛК ЧО тесно связаны с активацией адренергических нервных волокон автономной нервной системы [1, 6, 7, 9].

Проведенное исследование позволило выявить изменения в содержании БА в нейроаминсодержащих структурах ЧО при аутопересадке костного мозга. При этом выявлена активация клеток-продуцентов в ЧО у мышей с повышением содержания нейроаминов (КА, СТ).

Итак, в ЧО у мышей структурами, содержащими БА, являются ГЛК, ТК и адренергические нервные волокна. ГЛК и ТК располагаются в соединительной ткани всех оболочек, а адренергические нервные волокна в основной массе обнаруживаются между лимфоидными узелками.

При введении мышам собственного костного мозга наблюдается увеличение содержания КА и СТ с одновременным снижением — гистамина в ГЛК и ТК. В лимфоидных узелках происходит образование новых центров размножения, окруженных ГЛК и ТК.

ЛИТЕРАТУРА

- Гордон Д.С., Сергеева В.Е., Смородченко А.Т. Идентификация люминесцирующих гранулярных клеток тимуса с дендритными макрофагами // Бюл. exper. биол. 2001. Т. 132, № 7. С. 118–120.
- Захарова Л.А., Петров Р.В. Медиаторы нейроиммунного взаимодействия // Итоги науки и техники. Серия: Иммунология. ВИНТИ, 1990. Т. 25, № 2. С. 6–47.
- Любовцева Е.В., Любовцева Л.А. Биоаминсодержащие структуры костного мозга при системных заболеваниях крови // Морфология. 2012. Т. 141, вып. 3. С. 95–96.
- Любовцева Л.А., Ефремова О.А., Голубцова Н.Н. и др. Свойства гранулярных люминесцирующих клеток // Междунар. журн. по иммунореабилитации. 2009. Т. 11, № 1. С. 25–26.
- Савченко В.Г. Трансплантация костного мозга в онкогематологии. Клиническая онкогематология // Фундаментальные исследования и клиническая практика. 2010. Т. 3, № 4. С. 478–479.
- Ставинская О.А. Роль гистамина и серотонина в поддержании иммунного гомеостаза. Национальная конференция «Аллергология и клиническая иммунология — междисциплинарные проблемы» // Росс. аллергол. журн. 2008. № 1. С. 283–284.
- Шур В.Ю., Самотруева М.А., Мажитова М.В. Серотонин: биологические свойства и перспективы клинического применения // Фундаментальные исследования. 2014. № 7. С. 621–629.
- Яглова Н.В., Яглов В.В. Биология секреции тучных клеток // Клин. и эксперим. морфол. 2012. № 4. С. 4–9.
- 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. P. 1867–1875.
- Cross S.A.M., Ewen S.W.B., Rost E.W.D. A study of the methods available for the cytochemical demonstration of histamine by fluorescence induced with o-phthalaldehyde or acetaldehyde // J. Histochem. 1971. Vol. 6. P. 471–476.
- Falck B., Hillarp N.A., Thieme G., Torp A. Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde // J. Histochem. Cytochem. 1962. Vol. 10. P. 348–354.
- Thomas E.D. Nobel lecture, December 8, 1990. Bone marrow transplantation — past, present and future // J. Immunol. 1994. Vol. 39. P. 339–345.

Поступила в редакцию 15.01.2016

Получена после доработки 17.10.2016

CHANGES IN THE APPENDIX STRUCTURES CONTAINING BIOGENIC AMINES AFTER BONE MARROW AUTOTRANSPLANTATION

O. V. Vorobyova

The effect of bone marrow autotransplantation on neuroamine exchange in appendix structures was studied in the time aspect in female mice (n=90) with the use of histological, histochemical and morphometric methods. The study showed that 40 minutes after bone marrow autotransplantation the number of cells producing biogenic amines increased, and 2 hours later the content of neuroamines in them rose simultaneously with the increase in lymphocyte mitotic activity in lymphoid nodules germinal centers. Formation of new germinal centers surrounded by granular luminescent and mast cells was noted.

Key words: mast cells, granular luminescent cells, appendix, transplantation

Department of General and Clinical Morphology and Forensic Medicine, I.N. Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary