

УДК [599.323.4–114.4:616–089.843]:591.84

## ГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОСТНОГО МОЗГА ПРИ ГЕТЕРОПЕРЕСАДКЕ

<sup>1</sup>Воробьева О.В., <sup>1</sup>Любовцева Л.А., <sup>1</sup>Багрянцева М.Е., <sup>2</sup>Романов В.О., <sup>1</sup>Романова Л.П.

<sup>1</sup>«Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова», медицинский факультет,  
Чебоксары, e-mail: olavorobeva@mail.ru;

<sup>2</sup>Республиканский клинический онкологический диспансер, Чебоксары

Проведен анализ влияния гетеропересадки костного мозга на структурные изменения в костном мозге, изученные при иммуногистохимических исследованиях. В эксперименте животные разделены на группы. 0,1 мл костного мозга кошки смешивали в 1 мл физиологического раствора и вводили в хвостовую вену мышам. Число клеток в 1 мл суспензии было равно  $2,1 \cdot 10^8$ . В дальнейшем производилось гистохимическое исследование. У экспериментальных мышей было выявлено, что гетеропересадка костного мозга вызывает супрессию синтеза биогенных аминов и распад клеток-регуляторов. В конечном итоге происходит постепенное опустошение собственных клеток от нейроаминов, быстрое старение и гибель. При иммуногистохимическом исследовании выявили нарушение процессов пролиферации и апоптоза, приводящий к изменению дифференцировки клеток в костном мозге.

**Ключевые слова:** гетеропересадка, гранулярные клетки, тучные клетки

## HISTOCHEMICAL STUDY OF BONE MARROW TRANSPLANTATION STRAIGHT

<sup>1</sup>Vorobyova O.V., <sup>1</sup>Lyubovtseva L.A., <sup>1</sup>Bagryantseva M.E., <sup>2</sup>Romanov V.O., <sup>1</sup>Romanov L.P.

<sup>1</sup>Chuvash State University named after I.N. Ulyanov, Cheboksary, e-mail: olavorobeva@mail.ru;

<sup>2</sup>Regional Clinical Oncology Center, Cheboksary

The effect of bone marrow heteroperesadki on structural changes in the bone marrow studied with immunohistochemical studies. In the experiment, the animals were divided into groups. 0.1 ml of bone marrow was mixed cats in 1 ml of normal saline and injected into the tail vein of mice. Later histochemical study was carried out. The number of cells in 1 ml of the suspension was equal to  $2.1 \cdot 10^8$ . In experimental mice, it was found that bone marrow heteroperesadka suppresses the synthesis of biogenic amines and the disintegration of the cell-regulators. In the end, there is a gradual depletion of its own cells from neuroaminov, rapid aging and death. When immunohistochemical study revealed a violation of the processes of proliferation and apoptosis, which leads to changes in cell differentiation in the bone marrow.

**Keywords:** heteroperesadka, granular cells, mast cells

Трансплантация костного мозга применяется для лечения болезней, которые раньше считались неизлечимыми. Одной из разновидностей является гетеротрансплантация, при которой организм отвечает глубокой перестройкой как костномозгового кроветворения, так и иммунной системы [1, 2]. В настоящее время не изучены изменения нейроаминов при гетеропересадке в структурах костного мозга.

Цель – изучить нейроаминную регуляцию костного мозга после гетеропересадки.

### Материалы и методы исследования

Опытные мыши разделены на 3 группы: 1 группа – интактные мыши. 2 группа – контрольная группа мышей, у которых изменение нейроаминов происходит до 15 минут после введения физиологического раствора в дозе 1 мл. Вследствие этого материал для изучения брали с 15 мин после введения костного мозга. 3 группе производили гетеропересадку – взятый из бедренной кости 0,1 мл костного мозга кошки помещали в 1 мл физиологического раствора и тщательно размешивали. Полученную суспензию костного мозга вводили в хвостовую вену мышам. Подсчет числа клеток проводили с помощью проточного спектрофотометра «Ф-2000». Число клеток в 1 мл суспензии было равно  $2,1 \cdot 10^8$ .

### Методы:

1. Для избирательного выявления КА и СТ применялся люминесцентно-гистохимический метод.

2. Представление о количественном распределении тучных и гранулярных клеток дает метод подсчета их в 5 полях зрения микроскопа (увеличение  $40 \times 10$ ) [3].

3. Миелограмму рассчитывали на 500 клеток после окраски препаратов по Паппенгейму. 4. Иммуногистохимический метод, выявляющий маркер белка р 53 [4].

### Результаты исследования и их обсуждение

При исследовании препаратов костного мозга через 40 минут после гетерогенной пересадки выявлено увеличение содержания катехоламинов и серотонина в гранулярных люминесцирующих клетках, но их число резко снижено.

Выявлено полтора кратное увеличение числа тучных клеток. Содержание катехоламинов в них повышено, а серотонина – снижено. Появляются катехоламины в цитоплазме нейтрофилов и моноцитов.

При исследовании костного мозга через 60 минут содержание катехоламинов и серотонина в гранулярных люминесцирующих

клетках увеличивается в 2,5 раза. Повышается содержание катехоламинов в тучных клетках.

Выявляемость адренергических нервных волокон остается повышенной, особенно они определяются по ходу сосудов.

Через 4 часа определяется снижение числа тучных клеток в 1,7 раза с повышением в них катехоламинов. Гранулярные люминесцирующие клетки – единичны, содержание серотонина в них понижено, однако количество катехоламинов остается выше, чем у интактных животных. Их число минимально. Количество гемопозитических островков остается повышенным, но число митотически делящихся в них клеток снижается вдвое.

Увеличивается выявляемость мегакариоцитов. Среди всех форм мегакариоцитов на данном сроке выявляются оксифильные, зрелые структуры. Продолжают определяться нейтрофилы с повышенным содержанием в них серотонина.

Через сутки тучные клетки начинают определяться около липоцитов. Они мелкие, зеленые, число не велико до 2 клеток на одно поле зрения. В них снижено содержание и серотонина и катехоламинов. Происходит образование белой жировой ткани, в клетках которых накапливаются как катехоламины, так и серотонин, в основном в цитоплазме и ядре.

Около гемопозитических островков размножения и липоцитов обнаруживаются отдельные фрагменты нервных волокон. Впервые выявляются моноциты, которые в отличие от дендритных макрофагов имеют округлую форму, небольшие размеры и единичные слабо люминесцирующие гранулы. В увеличенных в размерах банальных макрофагах обнаруживаются частицы структур, содержащие серотонин. Можно предположить, что по размеру они подходят к трем структурам: микроцитам эритроидного ряда, тромбоцитам, или хиломикронам.

Через 2 суток цельные гранулярные люминесцирующие клетки не определяются. Люминесцируют лишь единичные гранулы. В отдельных гранулах содержание катехоламинов повышено, а серотонина – снижено (таблица).

Происходит дальнейшее увеличение жировой ткани, около групп липоцитов наблюдается увеличение числа тучных клеток, однако количество катехоламинов и серотонина в них снижено. Тучные клетки мельче обычных в 1,4 раза, имеют круглую форму. Очевидно, это молодые формы тучных клеток. Нервные волокна определяются в виде отдельных фрагментов в основном около групп жировых клеток.

#### Миелограмма на разных сроках после гетерогенной пересадки КМ

Через 15 минут повышается число всех клеток эритроидного ростка, на фоне резкого снижения числа миелобластов. Снижено число юных форм нейтрофилов и эозинофилов с одновременным повышением числа зрелых форм.

Через 40 минут число клеток эритроидного ряда остается повышенным за счет повышения процентного содержания базофильных и оксифильных нормоцитов. Остается повышенным процентное содержание миелобластов, а также клеток эозинофильного ряда, нейтрофильных метамиелоцитов и снижение числа палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов.

Через 1 час – отмечается снижение числа юных форм клеток эритроидного ряда с одновременным повышением процентного содержания миелобластов, молодых форм клеток эозинофильного ряда, со снижением числа зрелых форм клеток этого ряда. Резко увеличивается число сегментоядерных и палочкоядерных нейтрофилов.

Через 4 часа – определяется дальнейшее снижение числа клеток эритроидного ряда, уменьшение их размера, что говорит

Показатели интенсивности люминесценции катехоламинов в клетках костного мозга мышей после гетеропересадки (усл.ед.)

Название клеток	Время введения						
	Без введения	15 мин.	40 мин.	60 мин.	4 часа	1 сут.	2 сут.
ГЛК	15,6	28,1	19,2	38,3	54,2	5,2	Нет
ТК	19,6	57,2	20,6	48,5	29,6	7,4	Гранулы
Число ТК	4,2	4,1	5,1	4,0	0,9	0,7	-
Моноциты	6,3	-	-	-	27,4	29,1	29,7
Лимфоцит	4,8	8,1	-	-	13,4	13,6	-
МКЦ	-	-	-	10,6	28,2	17,3	13,2

Примечание. \* – достоверность отличий рассчитана по отношению к данным интактных мышей ( $p < 0,05$ ).

об истощении этого ростка. Одновременно происходит снижение числа клеток нейтрофильного ряда, миелобластов, эозинофилов. Увеличивается число юных форм (миелоцитов и метамиелоцитов). В цитоплазме эозинофилов появляются базофильные гранулы. ТК дегранулированы. Увеличивается число лимфоцитов.

Через сутки обнаруживается увеличение моноцитов, лимфоцитоподобных клеток, лимфоцитов и погибших клеток.

Через 2 суток наблюдается распад клеточных форм. Много обломков клеток. Наблюдается выброс гранул из эозинофилов, нейтрофилов. Число и размеры лимфоцитов значительно увеличиваются.

При иммуногистохимическом исследовании выявлена экспрессия белка р 53 в тучных и гранулярных клетках, однако их число значительно снижено, до 1 клетки на несколько полей зрения. Цитоплазма мегакариоцитов имеет слабую позитивную реакцию на белок р 53, интенсивность окраски на +2. Число лимфоцитов достигает 17 клеток на несколько полей зрения (при малом увеличении, х 100). Отметим значительное снижение интенсивности окраски всех структур костного мозга.

При гетеропересадках КМ наблюдается распад вышеуказанных клеток. Кроме того, экспрессируется данный белок в эндотелии сосудов, лимфоцитах, эозинофилах, нейтрофилах, ядрах плазматических клеток, что указывает на аллергическую реакцию в организме. Усиленная митотическая активность клеток указывает на усиление клеточного деления и процессов пролиферации.

Прогрессивное снижение числа клеток указывает на угнетение пролиферации своих собственных клеточных форм КМ

Таким образом, при подсадке чужеродного костного мозга резко снижается число аминокислотсодержащих клеток. Происходит распад тучных клеток. Однако, образуются жировые клетки, поддерживаемые вновь образующимися гранулярными люминесцирующими и тучными клетками, с повышенным в них содержанием аминов. Этот факт еще раз подтверждает способность гранулярных люминесцирующих и тучных клеток регулировать процессы репарации (восстановления) клеток при помощи нейромедиаторов.

При исследовании на белок р 53 выявляется прогрессивное снижение числа клеток, указывающее на угнетение пролиферации клеточных форм костного мозга. Кроме того, отметим создаются оптимальные условия для селекции клеток и миграции их в кровяное русло.

#### Список литературы

1. Быков В. Л. Развитие и гетерогенность тучных клеток / В.Л. Быков // Морфология. – СПб.: Эскулап, 2000. – Т. 117, № 2. – С. 82–92.
2. Любовцева Л.А., Любовцева Е.В. Биоаминсодержащие структуры костного мозга при системных заболеваниях крови / Л.А. Любовцева, Е.В. Любовцева // Морфология. – 2012. – №3. – С. 95–96.
3. Юшков Б.Г. Тучные клетки: физиология и патофизиология / Б.Г. Юшков, В.А. Черешнев, В.Г. Климин, О.С. Арташян. – М.: Медицина, 2011. – 240 с.
4. Чумаков П.М. Белок р53 и его универсальные функции в многоклеточном организме / П.М. Чумаков // Успехи биологической химии. – 2007. – Т. 47. – С. 3–52.