

ИЗМЕНЕНИЯ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ В СТРУКТУРАХ АППЕНДИКСА ПРИ АУТОПЕРЕСАДКЕ

Любовцева Е. В., Воробьева О. В., Любовцева Л. А.

ФГОУ ВПО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова», медицинский факультет, Чебоксары, Россия (428000, Россия, Чебоксары, Московский проспект, 45)

В работе изучено состояние ферментов, расщепляющих нейрамини в структурах аппендикса после аутогенной трансплантации костного мозга во временном аспекте. Под местной анестезией производили пересадку костного мозга. Извлекали аппендикс и проводили люминесцентно-гистохимические исследования. Нами выявлено, что в слизистой оболочке было увеличено число энтерохромаффинных клеток, указывающих об усилении синтеза нейрамина, которые поддерживают пролиферацию гемопоэтических клеток. Наиболее активная реакция исследуемых веществ происходила в лимфоидных узелках аппендикса. Появлялись новые центры размножения. Менялась активность моноаминоксидазы и кислой фосфатазы в подслизистом слое, что способствовало разрушению тучных и гранулярных клеток, что приводило к изменению цитодифференцировки клеток.

Ключевые слова: трансплантация костного мозга, моноаминоксидаза, кислая фосфатаза, тучные клетки.

CHANGES OF CERTAIN ENZYMES IN THE APPENDIX STRUCTURES IN AUTOGRAFT

Lyubovtseva E. V., Vorobyova O. V., Lyubovtseva L. A.

Chuvash state University. n.a. I.N. Ulyanov, medical faculty, Cheboksary, Russia (428000, Russia, Cheboksary, Moscow Avenue, 45)

The paper studied the state of enzymes that break down the structures neuroaminy appendix after autologous bone marrow transplantation in terms of time. Under local anesthesia, producing a bone marrow transplant. The appendix was removed and carried luminescent-histochemical studies. We have found that in the mucosa has increased the number of enterochromaffin cells, indicating an increased synthesis neuroaminov that support proliferation of hematopoietic cells. The most active analytes reaction occurred in the lymphoid nodules appendix. There were new breeding centers. Me awake monoamine oxidase and acid phosphatase in the submucosal layer, which contributed to the destruction of fat and granule cells, which led to a change in cytodifferentiation cells.

Keywords: bone marrow transplantation, monoamine oxidase, acid phosphatase, mast cells.

Трансплантация костного мозга используется для лечения многих гематологических, онкологических заболеваний [4, 5]. В последнее время в патогенезе онкозаболеваний все большее значение придается морфологическим структурам, участвующим в местной регуляции тканевых процессов. Для регуляции этих процессов большое значение имеют ферменты, которые вырабатываются этими структурами. Костный мозг, как известно, является универсальным органом иммуногенеза и кроветворения и оказывает большое влияние на соответствующие периферические органы. Он является и донором кроветворных клеток, и донором биологически активных веществ, которые в нем образуются [3].

Аппендикс является периферическим органом иммунногенеза, чрезвычайно насыщенный лимфоцитами, которые находятся как в свободном состоянии, так и в лимфоидных узелках. Эти 2 органа взаимодействуют между собой, начиная с эмбриогенеза и

на протяжении всей жизни, обеспечивая постоянство организма [6, 8]. Центральную роль в регуляции метаболизма биогенных аминов играют моноаминоксидаза (МАО) и кислая фосфатаза, участвующие в регуляции интранейрональной концентрации биогенных аминов.

Целью нашего исследования явилось выявить состояние ферментов в структурах аппендикса после аутогенной трансплантации костного мозга во временном аспекте.

Материал и методы исследования

Работа была выполнена на 30 мышах, которые, в свою очередь, были разделены на две группы по 15 мышей в каждой:

1 группа – контрольные мыши.

2 группе производили аутогенную пересадку костного мозга. Животным в хвостовую вену вводили суспензию костного мозга, полученную из бедренной кости от этой же мыши. Взятый из бедренной кости 1 мл костного мозга помещали в 2 мл физиологического раствора и тщательно размешивали. 1 мл суспензии костного мозга вводили в хвостовую вену (аутогенная трансплантация). 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 $2,1 \cdot 10^8$.

Все процедуры по уходу осуществлялись по нормам и правилам обращения с лабораторными животными.

В контроле, при введении 1 мл физиологического раствора, изменения содержания нейрамина в структурах происходили до 35 мин после трансплантации. Вследствие чего у животных брали аппендикс через 40 минут после трансплантации костного мозга и делали срезы или мазки.

В процессе решения поставленных задач использовались следующие методы:

1. С помощью гистохимической окраски по Гленнеру, выявляли моноаминоксидазу (МАО) – фермент, расщепляющий нейрамина.
2. Окраской по Ллойда определяли кислую фосфатазу (КФ), выявляли клетки способные к фагоцитозу (в основном макрофаги).
3. Люминесцентно-гистохимический метод Фалька-Хилларпа (1969) для изучения содержания катехоламинов и серотонина.
4. Люминесцентно-гистохимический метод Кросса, Евена, Роста (Cross S.A., Even S.W., Rost F.W., 1971) для выявления гистамина.
5. Статистическую достоверность определяли критерием Стьюдента (t). Полученные цифровые данные обрабатывались статистически по специально разработанной программе «Statistica», версия 6 (Copyright@Stat Soft, 19842001, ИПЧИ 31415926535897).

Результаты исследования и их обсуждение

Морфологическая картина аппендикса у интактных мышей – при окраске на MAO в эпителии слизистой оболочки обнаруживаются энтерохромаффинные клетки в количестве от 45 до 57 на поле зрения при 100x увеличении, а также тучные клетки. В собственной пластинке определяются цепочки гранул MAO, при параллельных окрасках эти цепочки соответствуют нервным волокнам.

В подслизистой оболочке располагаются лимфоидные узелки, внутри которых определяются тучные клетки, которые разделяются на компактные и дегранулированные, и гранулярные клетки. Часть определяемых гранулярных клеток можно отнести к дендритным макрофагам, которые входят в макрофагальную систему [1, 2, 3]. Известно, что макрофаги участвуют в регуляции кроветворения, продуцируя биогенные амины (колониестимулирующий фактор, интерлейкины, интерферон, эндорфин, гистамин, простагландины). Вещества, выделяемые макрофагами, оказывают воздействие на пролиферацию лимфоцитов, эритробластов, стимулируют грануло-, эритро-, моноцитопоз, регулируют функции фибробластов, мезангиальных клеток, пролиферацию клеток нервной ткани [6, 7, 8].

При исследовании морфологической картины аппендикса крыс на MAO через 40 минут после аутотрансплантации в эпителии крипт увеличилось число энтерохромаффинных клеток. В собственной пластинке *t. mucosae* произошло уменьшение общего числа тучных клеток: как цельных компактных, так и дегранулированных. Активность выявляемого фермента в этих клетках уменьшилась по сравнению с интактными животными.

В *t. submucosae* среди внутриузелковых клеток наряду с лимфоцитами обнаруживались как тучные клетки, так и макрофаги. После аутопересадки число «одиночных» тучных клеток возросло по сравнению с нормой. Активность фермента также увеличилась, поскольку кислая фосфатаза является маркерным ферментом клеток, обладающих макрофагальной активностью.

Тучные клетки представляли собой образования с четкими границами, имеющими в своем составе светлые, мелкие гранулы одинакового размера. Процесс активации тучных клеток играет одну из ключевых ролей при аутопересадке [9].

В увеличении численности тучных клеток в тканях могут участвовать различные механизмы. С одной стороны, тучные клетки или их предшественники могут мигрировать в эти зоны из периферической крови, с другой – предшественники тучных клеток могут активно пролиферировать, но только при активации вследствие патологического состояния

[7], поскольку тучно-клеточная популяция в норме имеет низкую способность к пролиферации в периферических тканях.

У интактных животных при окраске на кислую фосфатазу гранулярные клетки располагались по периферии лимфоидного узелка и по периферии центра размножения. На один лимфоидный узелок приходился один герминативный центр. Тучные клетки имели очень слабую реакцию (табл. 1).

При аутотрансплантации в лимфоидном узелке произошли изменения. На один лимфоидный узелок приходилось от 3 до 4 герминативных центров. Около каждого такого светлого центра, по его периферии обнаруживались положительные на кислую фосфатазу макрофаги и слабо окрашенные компактные тучные клетки.

Таблица 1

Число клеток в аппендиксе крыс, на одно поле зрения (увеличение: об. 90, ок. 7) у интактных животных и через 40 мин после трансплантации костного мозга

Метод обработки	Оболочка	Клетки	Интактные	Аутопересадка
Окраска на кислую фосфатазу	t. mucose	энтерохромаффинные клетки крипт	14,4 ± 1,2	17,8 ± 1,2
	t. submucose	Макрофаги	0,6 ± 1,2	0,6 ± 1,1
		Тучные клетки	11,8 ± 1,6	18,4±1,4

Приведенные данные дают основание высказать гипотезу, что разные типы тучных клеток образуют единую систему регуляции различных физиологических функций организма, играющую важную роль в патогенезе многих заболеваний.

Подводя итоги, мы можем сказать, что в слизистой оболочке было увеличено число энтерохромаффинных клеток, указывающих об усилении синтеза нейроаминов, которые поддерживают пролиферацию гемопозитических клеток.

После аутотрансплантации костного мозга в лимфоидных узелках появляется от 3-х до 4-х герминативных центров, что возможно связано с усиленным размножением лимфоцитов. Наиболее активная реакция исследуемых веществ происходит в макрофагах, лимфоидных узелках аппендикса, число которых увеличивается.

Активность MAO и кислой фосфатазы увеличивается среди внутриузелковых клеток, что способствует разрушению тучных и гранулярных клеток, что приводит к нарушению цитодифференцировки клеток. Полученные данные позволяют в дальнейшем использовать вещества стимулирующие функции нарушенных нейромедиаторов, что приведет к регуляции тканевых процессов.

В препаратах, обработанных по методу Кросса, в криптах были обнаружены следующие изменения. Увеличение числа тучных клеток до 12,9±1,2 при норме 8,0±1,2, однако,

отмечается снижение гистамина в этих клетках до $18,1 \pm 1,6$ при норме $21,2 \pm 0,3$ у.е. (диаграмма 1).

Люминесцентно-гистохимическая морфология аппендикса мышей через 40 минут после аутотрансплантации костного мозга

В лимфоидных узелках также отмечается увеличение числа тучных клеток до $7,2 \pm 0,3$ при норме $5,6 \pm 0,3$, снижение гистамина в этих клетках до $7,2 \pm 0,2$ при норме $13,4 \pm 0,2$ у.е. Отмечается увеличение числа ГЛК до $3,5 \pm 0,9$ при норме $2,0 \pm 0,9$, содержание гистамина во внутриузелковых ГЛК снизилось до $8,3 \pm 0,6$ при норме $16,2 \pm 0,7$ у.е. В микроокружении внутриузелковых клеток увеличения числа клеток не произошло. Содержание гистамина снизилось до $6,2 \pm 0,7$ при норме $10,0 \pm 0,8$ у.е. (табл. 2).

Таким образом, по данным люминесцентно-гистохимических методов исследования имеется большое число структур, продуцирующих нейромедиаторы – это ГЛК и ТК.

В срезах аппендикса, обработанных по методу Фалька-Хилларпа на КА и СТ, отмечалось увеличение числа тучных клеток в криптах до $6,8 \pm 2,3$ при норме $5,4 \pm 2,3$, число ГЛК осталось без изменений $1,4 \pm 3,1$. Содержание КА и СТ в тучных клетках слизистой возросло до $8,6 \pm 1,4$ и $11,6 \pm 1,6$ у.е, в ГЛК до $6,8 \pm 0,3$ и $13,8 \pm 0,4$ у.е. соответственно (табл. 2).

В лимфоидных узелках произошло увеличение числа тучных клеток и составило $8,1 \pm 0,7$, при норме $5,2 \pm 0,6$ для тучных и $14,1 \pm 1,1$ при норме $11,4 \pm 1,1$ для ГЛК. Содержание КА и СТ в тучных клетках составило $4,9 \pm 0,5$ при норме $3,9 \pm 0,4$ у.е. и $6,2 \pm 0,5$ при норме $5,8 \pm 0,6$ у.е., в ГЛК $8,5 \pm 0,3$ при норме $7,1 \pm 0,5$ у.е. и $12,1 \pm 0,3$ при норме $10,4 \pm 1,8$ у.е. соответственно (табл. 2).

Таблица 2

Содержание биогенных аминов в аппендиксе мышей, в норме и через 40 мин после аутотрансплантации костного мозга (у. е.)

Структуры	Интактные мыши			Аутопересадка		
	КА	СТ	Г	КА	СТ	Г
Слизистая оболочка						
ГЛК	$6,5 \pm 0,4$	$13,4 \pm 0,8$	$22,4 \pm 1,6$	$6,8 \pm 0,3$	$13,8 \pm 0,4$	$18,6 \pm 1,8$
ТК слизистой	$8,0 \pm 1,2$	$11,1 \pm 1,7$	$21,2 \pm 0,3$	$8,6 \pm 1,4$	$11,6 \pm 1,6$	$18,1 \pm 1,6$
Микроокружение клеток слизистой оболочки	$4,4 \pm 0,6$	$6,5 \pm 0,8$	$16,2 \pm 0,8$	$5,4 \pm 0,2$	$9,6 \pm 0,6$	$8,6 \pm 0,5$
Подслизистая оболочка						
Тучные клетки лимфоидного узелка	$3,9 \pm 0,4$	$5,8 \pm 0,6$	$13,4 \pm 0,2$	$4,9 \pm 0,5$	$6,2 \pm 0,5$	$7,2 \pm 0,2$
Внутриузелковые ГЛК	$7,1 \pm 0,5$	$10,4 \pm 1,8$	$16,2 \pm 0,7$	$8,5 \pm 0,3$	$12,1 \pm 0,3$	$8,3 \pm 0,6$
Микроокружение	$2,7 \pm 0,3$	$4,6 \pm 0,5$	$10,0 \pm 0,8$	$2,8 \pm 0,1$	$5,5 \pm 0,2$	$6,2 \pm 0,7$

внутриузелко- вых клеток						
Береговые макрофаги	9,0±0,8	13,7±0,9	19,5±1,1	17,2±2,3	26,8±3,4	8,1±1,5
Микроокруже ние береговых макрофагов	4,5±0,1	6,5±0,2	8,8±0,5	2,4±0,2	4,3±0,2	14,4±0,2

Выводы

1. В лимфоидных узелках появляется от 3-х до 4-х герментативных центров, что, возможно, связано с усиленным размножением лимфоцитов.
2. При аутотрансплантации костного мозга через 40 минут в подслизистом слое аппендикса увеличивается активность ферментов, что приводит к дегрануляции тучных и гранулярных клеток.
3. Изменяется содержание нейроаминов.

Список литературы

1. Волчегорский И.А., Малиновская И.В., Шумелева О.В. и соавт. Динамика активности моноаминоксидазы В и ферментов антиоксидантной защиты головного мозга в процессе постнатального развития человека // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 2006. – Т. 142. – № 8. – С. 158-166.
2. Гордон Д.С., Сергеева В.Е., Смородченко А.Т. и соавт. Идентификация люминесцирующих гранулярных клеток тимуса с дендритными макрофагами // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2001. – Т. 132. – № 7. – С. 118-120.
3. Любовцева Е.В., Любовцева Л.А. Биоаминсодержащие структуры костного мозга при системных заболеваниях крови // Морфология. – 2012. – № 3. – С. 95-96.
4. Репин В.С., Сабурин И.Н. На пути к расшифровке кодов эмбриональных стволовых клеток // Клеточная Трансплантология. – 2008. – № 3. – С. 30-35.
5. Савченко В.Г. Трансплантация костного мозга в онкогематологии // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2010. – Т. 3. – № 4. – С. 478-479.
6. Юшков Б.Г., Черешнев В.А., Климин В.Г. и соавт. Тучные клетки: физиология и патофизиология. – 2011. – 237 с.
7. Metcalfe D.D., Baram D., Mekori Y. Mast cells Text. // Physiol. Rev. 1997, Vol. 77, pp. 1033–1079.

8. Parekkadan B., Daan van Poll, Kazuhiro Suganuma et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Molecules Reverse Fulminant Hepatic Failure // Biochem Biophys Res Commun in press. 2007, no. 9, pp. 941-947.

Рецензенты:

Малышев И. И., д.м.н., профессор кафедры общей и клинической морфологии и судебной медицины ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный университет имени И. Н. Ульянова», г. Саранск;

Иванов Л. Н., д.м.н., профессор кафедры нормальной и патологической анатомии ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный университет имени И. Н. Ульянова», г. Саранск.