

## РОЛЬ БИОГЕННЫХ АМИНОВ ПРИ АЛЛОТРАНСПЛАНТАЦИИ КОСТНОГО МОЗГА

Романова Л.П., Воробьева О.В., Любовцева Л.А.

*ФГОУ ВПО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова», Чебоксары, Россия (428000, Россия, Чебоксары, Московский проспект, 45), olavorobeva@mail.ru*

У опытных животных, которым производили трансплантацию костного мозга, были изучены гранулярные и тучные клетки в костном мозге, которые являются местными регуляторами процессов, происходящих в костном мозге при пересадке. Производили трансплантацию костного мозга. Затем срезы и мазки окрашивались люминесцентно-гистохимическими методами. Было выявлено, что у экспериментальных мышей снижается число клеток-регуляторов, а в них содержание биогенных аминов. Резко увеличивается активность моноаминоксидазы, которая осуществляет окислительное дезаминирование, является ферментом с выраженной биологической универсальностью. Также изменяется коэффициент корреляции в КМ на противоположный в гранулярных люминесцирующих клетках и в тучных клетках, что указывает на активацию процессов утилизации излишков нейроаминов и возможно гибнущих клеток. Таким образом, аллотрансплантация костного мозга приводит к распаду клеток-регуляторов, с нарушением синтеза нейроаминов, что приводит к нарушению межклеточной регуляции органов.

Ключевые слова: трансплантация костного мозга, гранулярные люминесцирующие клетки (ГЛК), тучные клетки (ТК), катехоламины (КА), серотонин (СТ), гистамин.

## THE ROLE OF BIOGENIC AMINES ALLOGRAFT IN BONE MARROW

Romanova L.P., Vorobyova O.V., Lyubovtseva L.A.

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

In experimental animals that produce bone marrow transplantation were studied the granular-nye and mast cells in the bone marrow, which are local regulators of the processes occurring in the bone marrow for the transplant. We produce bone marrow transplantation. The sections were then stained smears and luminescent-histochemical methods. It was found that the treated mice reduced the number of cell-regulators, and in which the content of biogenic amines. Dramatically increase the activity of monoamine oxidase-Xia, which carries out oxidative deamination, an enzyme with significant biological versatility. Also, changes in the correlation coefficient in the opposite CM granular luminescing-ing cells and mast cells, indicating activation processes of recycling excess neuro-amines and possibly dying cells. Thus, allograft bone marrow leads to the disintegration of cells controllers, in violation neyroaminov synthesis, which leads to disruption of intercellular fine-regulation bodies.

Keywords: bone marrow transplantation, granular luminescent cells (HCA), mast cells (MC), catecholamines (CA), serotonin (ST), histamine

Согласно данным литературы, биогенные амины способны воздействовать на функциональное состояние органов иммунной, кроветворной, нервной и других систем организма [5]. Изучение нейромедиаторного состава костного мозга необходимо, т.к. большинство гематологических заболеваний связано с нарушением процесса обмена биогенных аминов в клетке, приводящие к возникновению патологических сдвигов в функции костного мозга и других лимфоидных органов [3].

Трансплантация костного мозга, при которой происходит воздействие на иммунную и связанную с ней кроветворную систему организма, используется для лечения большинства онкологических заболеваний [1,4,6]. По литературным данным [2,3] основными клетками,

содержащими биогенные амины (БА), такие как гистамин, катехоламины (КА) и серотонин (СТ), считаются тучные клетки и ГЛК, тесно связанные с вегетативной нервной системой, ее адренергическим и парасимпатическим звеном [7]. Эти структуры по данным многих авторов являются местными регуляторами процессов, происходящих в кроветворных органах. Поэтому **целью нашего исследования** явилось выявить роль биогенных аминов в костном мозге после аллотрансплантации во временном аспекте.

### **Материал и методы исследования**

Работа была выполнена на 30 мышах, разделенные на 2 группы.

1 группа – интактные животные.

2 группе производили аллогенную пересадку костного мозга. Животным в хвостовую вену вводили суспензию костного мозга, полученную из бедренной кости от другой мыши. Взятый из бедренной кости 1 мл костного мозга помещали в 2 мл физиологического раствора и тщательно размешивали. 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. Приготовленные срезы окрашивали люминесцентно-гистохимическим методом Кросса, Евена, Роста (Cross S.A., Even S.W., Rost F.W., 1971) для выявления гистамина. Люминесцентно-гистохимический метод Фалька-Хилларпа (1969) для изучения содержания катехоламинов и серотонина. Количественно уровень КА, СТ и гистамина в структурах оценивались с помощью цитоспектрофлуориметрии. Для качественной и количественной характеристики тучных клеток после их изучения по Кроссу, Евена, Роста (1971) и цитоспектрофлуориметрии, обрабатывали полихромным толлуидиновым синим по А. Унна. Окраска по А. Унна применялась для определения состояния тучных клеток. С помощью гистохимической окраски по Гленнеру, выявляли моноаминоксидазу (МАО) – фермент, расщепляющий нейроамины. Статистическую достоверность определяли критерием Стьюдента (t). Полученные цифровые данные обрабатывались статистически по специально разработанной программе «Statistica 7».

### **Результаты исследования и их обсуждение**

У опытных животных через 15 мин. гистаминсодержащие ТК и ГЛК не содержали гистамина. Люминесцировали клетки эритроидного ряда, лимфоциты и ядра плазмоцитов. Выявлялись группы ярко люминесцирующих митотически делящихся клеток.

Содержание КА и СТ было снижено в два раза как в ГЛК, так и в ТК. Однако выявлялись мегакариоциты, у которых содержание всех исследованных веществ было несколько повышено.

Через 40 минут при исследовании на КА и серотонин свечение было резко сниженным, наблюдалась диффузия препарата. Число ТК и ГЛК было также снижено до 1 – 2 на несколько полей зрения при иммерсионном увеличении, с уменьшением в них в два раза количества КА и СТ (табл. 1). В большом числе выявлялись округлые клетки со светящимися мелкими зернами и несветящимся бобовидным ядром (макрофаги). У мегакариоцитов не люминесцировали ядра, однако светилась цитоплазма. Нервные волокна не выявлялись.

Таблица 1

Содержание нейроаминов в биоаминсодержащих клетках через 40 мин после аллотрансплантации костного мозга

Название клеток	Содержание нейроаминов, у.е.					
	КА		СТ		Гистамин	
	Интактные	Алло-	Интактные	Алло-	Интактные	Алло-
ГЛК	15,6±0,1	8,8±0,1	14,1±0,1	9,7±0,1	31,6±0,3	17,6±0,3
ТК	19,6±0,2	10,1±0,2	21,3±0,4	11,3±0,4	28,1±0,2	12,4±0,2
Число ТК	4,2±0,1	0,6±0,1	4,2±0,1	0,6±0,1	4,2±0,1	0,3±0,1

Примечание: даны среднеарифметические цифры

± амплитуда колебания содержания веществ

ГЛК и ТК выявлялись в виде темно-оранжевых теней с расположенными рядом гранулами. Произошел тотальный распад этих клеток. Такие клетки не содержали свободного гистамина.

Таким образом, в костном мозге через 15 мин после аллогенной пересадки костного мозга снижается число тучных и ГЛК с понижением содержания биоаминов в них.

Через 40 мин число тучных и ГЛК остается сниженным в результате тотального распада ТК и снижения числа люминесцирующих гранул в ГЛК с уменьшенным содержанием биоаминов в них.

Аллогенная пересадка, очевидно, вызывает супрессию синтеза биогенных аминов и распад клеток-регуляторов.

Через 15 мин увеличивается содержание индолсодержащих веществ в гранулах эозинофилов, в ядрах эритробластов и лимфоцитов, и снижается его содержание в гранулах нейтрофильного ряда и ТК.

Через **40 минут** индолсодержащие вещества в мазках костного мозга мышей определяются также в основном в ядрах клеток. Происходит группировка сходных клеток, и

определяются группы лимфоцитов, окрашенные более интенсивно. Наблюдается увеличение числа митозов практически во всех видах клеток.

При окраске препаратов по Унна все клетки окрашены одинаково ортохромно, за исключением эозинофильного ряда, где в цитоплазме выявляется легкая метахромазия. Чем моложе клетка, тем слабее окрашено ее ядро.

Выявляются 3 вида ТК, окрашенные В-метахроматично: одни мелкие с ассиметрично расположенными голубыми ядрами, другие овальные с центрально расположенным ядром, третьи – дегранулированные вплоть до тотального распада.

Увеличивается содержание нейроспецифической енолазы в ТК, число которых возросло более чем в 1,5 раза. Причем увеличилось процентное содержание мелких компактных клеток – молодых. Число гранулярных клеток также увеличилось за счет крупных клеток разного размера. Предположительно произошло увеличение выявляемости клеток, принадлежащих к АПУД - системе.

Часть тучных клеток становятся высоко сульфатированными, наблюдается их дегрануляция. Нейроамины накапливаются в межклеточном веществе.

Вследствие чего увеличивается число митозов, образуются шаровидные скопления морфологически одинаковых клеток, по периферии которых располагаются ГЛК. Происходит стимуляция митотической активности клеток.

При исследовании препаратов **по Паппенгейму** определяются одинаковые клетки, расположенные группами, среди которых имеются митотически делящиеся. Миелограмма указывает на то, что число бластных форм, клеток эритроидного ряда увеличилось. Содержание зрелых лейкоцитов резко снизилось (табл.2).

Таблица 2

Миелограмма у интактных мышей и после аллопересадки КМ

Название клеток	Число клеток в норме	Аллопересадка
Бласты	3,4±0,83	7,6±0,83
Эритроидный ряд	28,7 ± 0,1	60±0,1
Ретикулоциты	1,5±0,1	1,4±0,1
Промиелоциты	1,5±0,1	0,7±0,1
Метамиелоциты эозинофильные	5,2±0,1	4,1±0,1
Сегментоядерные эозинофилы	3,6±0,1	2,7±0,1
Метамиелоциты нейтрофильные	3,5±0,1	3,4±0,1
Палочкоядерные нейтрофилы	8,5±0,2	6,2±0,1
Лимфобласты	12,5 ± 0,1	3,4±0,1

МКЦ	0,7 ±0,1	0,9±0,1
-----	----------	---------

Примечание: Расчет производили на 500 клеток.

### **Внутриорганные нейромедиаторные взаимодействия в ГЛК и ТК костного мозга после аллотрансплантации**

При изучении корреляционных взаимодействий через 40 мин после аллогенной трансплантации костного мозга наблюдалась дегрануляция некоторых ТК и гашение люминесценции нейроаминов, за счет выхода их из клеток-регуляторов. Однако, коррелятивные связи в этих клетках все положительные. Сильные связи в ГЛК были между КА и СТ, а в ТК все связи оказались сильными. Это говорит о том, что в оставшихся клетках продолжается синтез нейроаминов. В межклеточном пространстве эти нейроамины действовали на гемопозитические клетки совместно, в тандеме (табл.3).

Серотониновый индекс и в ГЛК и ТК был выше 1, ведущим медиатором является серотонин. Это говорит о том, что увеличиваются процессы сдерживания делящихся клеток.

Резко увеличилось содержание моноаминоксидазы в ТК и ГЛК, эозинофилах, макрофагах, в межклеточном пространстве. В ГЛК моноаминоксидаза определяется в единичных гранулах.

При реакции на КФ, этот фермент обнаруживается в моноцитах, сегментоядерных нейтрофилах. Все это говорит об активации процессов утилизации излишков нейроаминов и возможно гибнущих клеток.

Таблица 3

Корреляционные взаимодействия нейроаминов в гранулярных люминесцирующих и тучных клетках при аллотрансплантации

Структуры	Сроки после трансплантации		
	взаимодействия	интактные	40 мин
ГЛК	КА/СТ	-0,9	0,9
	СТ/гистамин	0,4	0,5
	КА/гистамин	-0,5	0,5
	Серотониновый индекс	0,9	1,1
ТК	КА/СТ	0,9	0,9
	СТ/гистамин	0,8	0,8
	КА/гистамин	-0,7	0,75
	Серотониновый индекс	1,09	1,1

Анализируя полученные данные выявлено, что при аллопересадке костного мозга снижалось число ГЛК и ТК, с пониженным содержанием в них КА и СТ, наблюдалась

диффузия препарата. Нервные волокна не выявлялись. При исследовании на гистамин наблюдали в некоторых местах резкое снижение диффузного свечения межклеточных пространств и гемопоэтических клеток, в других областях происходило усиление люминесценции межклеточных пространств. Число ГЛК и ТК было снижено, люминесцировали темно-оранжевым цветом, вследствие тотального распада. Такие клетки не содержали свободного гистамина. Вначале выявлялись митотически делящиеся группы клеток. Далее митотическая активность резко снижалась.

Таким образом, аллотрансплантация костного мозга сопровождалась распадом клеток-регуляторов, нарушенным синтезом нейроаминов, нарушением межклеточных регуляций иммунологических и кроветворных органов.

#### **Выводы:**

1. Аллопересадка костного мозга вызывает глубокие изменения в перераспределении нейромедиаторов в биоаминосодержащих структурах костного мозга.
2. С начала эксперимента развивается сдерживание выделения нейромедиаторов биоаминосодержащими структурами костного мозга, а в последующем наблюдается распад ГЛК и ТК.
3. Изменяется коэффициент корреляции в КМ на противоположный в ГЛК во взаимодействиях КА и СТ, КА и гистамин. В ТК во взаимодействиях КА и гистамин.
4. В миелограмме отмечено увеличение числа бластных форм, клеток эритроидного ряда. Содержание зрелых лейкоцитов резко снизилось

#### **Список литературы**

1. Богданов Р.Ф., Менделеева Л.П., Кузьмина Л.А. Длительная ремиссия хронического миелолейкоза на фоне смешанного химеризма после трансплантации аллогенного костного мозга// Гематология и трансфузиология. – 2014.- Т.59. - № 1.- С.38-41.
2. Гордон Д.С., Сергеева В.Е., Смородченко А.Т. 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// Ж. Морфология. - 2012. - №3. - С. 95-96.
4. Мелкова К. Н., Горбунова Н. В., Чернявская Т. З. Смешанный химеризм после аллогенной трансплантации костного мозга: собственные клинические наблюдения// Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика.- 2013.- Т.6.- №1.- С.40-44.

5. Шур В. Ю. Саотруева М. А., Мажитова М. В. Серотонин: биологические свойства и перспективы клинического применения. *Фундаментальные исследования*. - 2014.- № 7-3. - С. 621-629.
6. Metcalfe D.D., Baram D., Mekori Y. Mast cells Text. // *Physiol. Rev.* 1997, Vol. 77, pp. 1033 - 1079.
7. 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. Чебоксары;

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