



DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-166-6-100-104

УДК 599.323.4–114.4:616–089.843–032

Воздействие аллотрансплантации костного мозга на нейромедиаторные клетки *appendix vermiformis*

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

Чувашский государственный университет им. И. Н. Ульянова, 428000, Чебоксары, Московский пр., 15

Effect of bone marrow allotransplantation on neurally mediated *appendix vermiformis* cells

O. V. Vorobeva, L. A. Lubovceva, N. E. Gimaldinova

I. N. Ulianov Chuvash State University, 15, Moskovsky Av., Cheboksary, 428000

Для цитирования: Воробьева О. В., Любовцева Л. А., Гималдинова Н. Е. Воздействие аллотрансплантации костного мозга на нейромедиаторные клетки *appendix vermiformis*. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2019;166(6): 100–104. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-166-6-100-104

For citation: Vorobeva O. V., Lubovceva L. A., Gimaldinova N. E. Effect of bone marrow allotransplantation on neurally mediated *appendix vermiformis* cells. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2019;166(6): 100–104. (In Russ.) DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-166-6-100-104

✉ *Corresponding author:*

Воробьева Ольга В.

Olga V. Vorobeva
olavorobeva@mail.ru

Резюме

Описаны люминесцентно- и иммуногистохимические изменения в разных морфо-функциональных зонах *appendix vermiformis* после аллотрансплантации костного мозга у животных. Полученные данные свидетельствуют об увеличении числа тучных и гранулярных люминесцирующих клеток с повышенным содержанием биогенных аминов в них через 40 мин после трансплантации. В центре размножения лимфоидных узелков *appendix vermiformis* определялись клеточные диффероны с высоким содержанием катехоламинов и серотонина. Выявлялась пролиферативная активность клеток как в собственной пластинке *t. mucosa* крипт, так и в лимфоидных узелках *appendix vermiformis*. Через 2 часа у опытных животных происходило уменьшение числа ТК и ГЛК как в *t. mucosa*, так и в *s/mucosa appendix vermiformis* и снижалось содержание катехоламинов и серотонина в них, что приводило к снижению пролиферативной активности клеток.

Ключевые слова: трансплантация, *appendix vermiformis*, гранулярные люминесцирующие клетки, тучные клетки, катехоламины, серотонин

Summary

Luminescent and immunohistochemical changes in various morpho-functional areas of *appendix vermiformis* after bone marrow allotransplantation in animals are described. The obtained data indicate an increase in mast and granular luminescent cells with an increased content of biogenic amines in them in 40 minutes after transplantation. In the germinal centre of lymphoid nodes in *appendix vermiformis* cellular programmed differentiations with a high content of catecholamines and serotonin were defined. An active proliferative cellular activity both in lamina propria in crypts' *t. mucosa* and in lymphoid nodules of *appendix vermiformis* was identified. In 2 hours in experimental animals the number of MCs and GLCs decreased both in *t. mucosa* and in *s/mucosa appendix vermiformis* and the content of catecholamines and serotonin in them decreased, which resulted in a decrease in proliferative cellular activity.

Keywords: transplantation, *appendix vermiformis*, granular luminescent cells, mast cells, catecholamines, serotonin

Заболеемость иммунопролиферативными заболеваниями, разными формами рака и наследственной патологией во всем мире, в том числе в России, имеет тенденцию к увеличению [5]. В последние годы актуальность этой проблемы все повышается в связи с тем, что увеличивается промышленная индустрия, предприятия атомной промышленности. Высокие цифры заболеваемости злокачественными иммунопролиферативными заболеваниями встречаются достаточно часто, особенно у лиц пожилого и старческого возраста и занимает первое место в структуре летальности [5]. Использование адекватного лечения привело к значительному улучшению результатов, в некоторых случаях к увеличению продолжительности жизни, однако часто у пациентов пожилого и старческого возраста возникают посттрансплантационные осложнения. В связи с этим, продолжаются поиски оптимальных методов коррекции терапии для таких пациентов.

Злокачественные новообразования связаны с нарушением метаболизма биогенных аминов в клетке, приводящие к развитию патологических сдвигов в функционировании красного костного мозга [1,6]. Биогенные амины (катехоламины, серотонин) синтезируются в тучных и гранулярных

люминесцирующих клетках, которые с помощью мембранных рецепторов взаимодействуют с другими клетками кровяных органов и соответственно, участвуют в регуляции дифференцировки и пролиферации клеток [1,6]. Необходимо искать органы, синтезирующие биогенные амины в своем собственном организме. Таким органом может оказаться *appendix vermiformis*, так как он осуществляет защитную функцию, скопления лимфоидной ткани в нем входят в состав периферических отделов иммунной системы. Лимфоидные фолликулы организованы подобно лимфатическим узлам, со смешанной зоной Т-клеток, В-клеток и макрофагов, мантийной зоной В-клеток, зародышевым центром, содержащим В-клетки, фолликулярными дендритными клетками и макрофагами и область Т-клеток (CD4 + Т-клетки встречаются в 8 раз чаще, чем CD8 + Т-клетки), которые также содержат макрофаги. Иммунные клетки, состоящие преимущественно из специфических CD8 + Т-регуляторных лимфоцитов, занимают участки, аналогичные тем, которые присутствуют в эпителии кишечника слепой кишки [10].

Цель исследования – изучение воздействия аллотрансплантации костного мозга на нейромедиаторные клетки *appendix vermiformis*.

Материалы и методы

Исследование проведено на половозрелых крысах-самцах 2 месячного и 32-месячного возраста линии *Wistar*. Животные находились на стандартной сбалансированной диете в виварии ФГБОУ ВО «ЧГУ им. И. Н. Ульянова». Эксперименты проводились с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации, в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

В эксперименте использовали 3 группы животных: 1 – крысы 2-х месячного возраста (молодые) (n-15), 2 – контрольные (2-х месячные) (n-15), вводили физиологический раствор в дозе 1мл/кг массы тела. Изменения в содержании нейроаминов наблюдали до 30 мин эксперимента, далее показатели были идентичными с показателями интактных мышей, в связи с этим, мы учитывали сроки с 40 мин после эксперимента, 3 – крысы 32-х месячного возраста (старые) – проведение аллотрансплантации (n-15). Из эпифиза бедренной кости извлекали костный мозг, разводили в 2 мл физиологического раствора, затем вводили в хвостовую вену другой крысе [9]. Животных выводили из эксперимента через 40 мин и 2 ч после аллотрансплантации костного мозга путем передозировки эфирного наркоза.

Для определения содержания катехоламинов и серотонина применяли люминесцентно-гистохимический метод Фалька–Хилларпа (1962) [7]. Свежезамороженные срезы *appendix vermiformis* выдерживали в термостате с парами параформальдегида на протяжении одного часа, затем срезы заключались в полистирол. Гистопрепараты изучались с помощью микроскопа «Люмам-6» (ЛОМО, Россия), подсчитывали число гранулярных и туч-

ных клеток в 5 полях зрения. Содержание катехоламинов и серотонина оценивали при помощи микрофлуориметрической насадки к люминесцентному микроскопу ФМЭЛ-1А. Показания снимали с измерительной части усилителя вольтметра при напряжении 900 вольт, с зондом 0,2 в условных единицах. Статистическая обработка проведена с помощью критерия U Манна-Уитни ($p < 0,05$).

С помощью иммуногистохимического исследования оценивали пролиферативную активность с помощью маркера *Ki-67*, при этом результат оценивали по коричневой окраске ядер. Использовали моноклональные антитела к маркеру *Ki-67*, клон ММ-1 (NovoCastra, Великобритания).

Срезы *appendix vermiformis* толщиной 3 мкм, обработанные *Lpolsine*, подсушивали при комнатной температуре на протяжении суток. Окрашивали с помощью «Autostainer-360» (THERMO, Великобритания) и «Leica BOND-MAX» (Германия). После фиксации в формалине и заключения в парафин материала в течение 20 мин гистологические срезы выдерживали на водяной бане в 0,01 М цитратном буферном растворе (pH 6) при 95 °С. Инкубацию с первичными антителами *Ki-67* проводили при комнатной температуре в течение часа. Для визуализации продуктов иммунной реакции использовали стрептавидин-биотиновый пероксидазный метод («Dako», *LSAB+Kit*, *HRP*), в качестве красящего соединения был применен раствор диаминобензидина («Dako», *Liquid DAB+*), ядра докрасивали гематоксилино-эозином. С помощью микроскопа «Leica DM4000B» и цветной фотокамеры «Leica DFC425» исследовали микропрепараты (×400, ×900). Проводили подсчет числа окрашенных ядер к числу неокрашенных (%) (<http://imtmicroscope.fi/immunoratio/>).

Результаты и обсуждение

Люминесцентно-гистохимический метод Фалька–Хилларпа

Через 40 мин после аллотрансплантации костного мозга в эпителии крипт *appendix vermiformis* определялась темно-зеленая люминесценция. Содержание катехоламинов в эпителии крипт увеличивается на 66%±14%, а серотонина на 201%±18% по сравнению с молодыми крысами.

В соединительной ткани *t. mucose* крипт определялись мелкие тучные клетки, наблюдается увеличение числа этих клеток на 42%±9% и гранулярных люминесцирующих клеток на 14%±8% соответственно. В них повышается содержание катехоламинов и серотонина на 170%±14% и 160%±14% для тучных клеток, в гранулярных люминесцирующих клетках на 73%±10% и 6%±5% (табл. 1).

В *t. s/mucose* в лимфатических узелках отмечается высокое число гранулярных люминесцирующих и тучных клеток. По краю лимфатического узелка прослеживался краевой синус, в котором определялись наиболее крупные гранулярные люминесцирующие клетки с наибольшей люминесценцией. Это были клетки, принадлежащие к АПУД-системе, в них происходило увеличение содержания катехоламинов на 142%±7% и 128%±9% для серотонина. Увеличилось содержание этих веществ в микроокружении этих клеток.

В синусных макрофагах наблюдалось снижение биогенных аминов на 44%±4% катехоламинов и 51%±3% серотонина по сравнению с молодыми животными. В микроокружении береговых макрофагов наблюдалось увеличение биогенных аминов

до 5,6±0,1 катехоламинов и 8,2±0,1 серотонина при норме 4,5±0,1 и 6,5±0,2 у.е. (табл. 1).

Число внутриузелковых гранулярных люминесцирующих клеток увеличилось на 182%±7%, а тучных клеток на 174%±6%. Здесь гранулярные люминесцирующие клетки были меньшего, чем обычно, размера и располагались преимущественно по периферии центра размножения, имели желтую и зеленую люминесценцию (табл. 1).

Тучные клетки обнаруживались, как и по периферии центра размножения, так и внутри его. Содержание биогенных аминов увеличивается в них по сравнению с молодыми животными и составляет 152%±10% для катехоламинов и 153%±9% для серотонина. В микроокружении тучных клеток содержание катехоламинов увеличилось незначительно и составило 112%±7%. Изменения содержания серотонина были более значительны, и составили 138%±8%.

В центре размножения лимфоидных узелков *appendix vermiformis* определялись клеточные диффероны, в состав которых входят гранулярная люминесцирующая, ретикулярная клетка, макрофаг. В этих клетках по сравнению с молодыми животными, отмечается увеличение содержания катехоламинов и серотонина на 110%±9%. Число таких клеточных комплексов увеличилось на 106%±7% по сравнению с крысами 2-х месячного возраста и составило 32,6±0,3 у.е., у молодых – 15,3±0,2 у.е. (табл. 1).

Таблица 1

Содержание биогенных аминов в *appendix vermiformis* у молодых крыс и через 40 мин после аллотрансплантации костного мозга (усл. ед.)

Примечание.

ГЛК – гранулярные люминесцирующие клетки, КА – катехоламины, СТ – серотонин; уровень статистической значимости различий, *p*<0,05.

Локализация	Биогенный амин	Клетки	2-х мес крысы	Аллопересадка через 40 мин	Аллопересадка через 2 часа
<i>t. mucose</i>	КА	Тучные клетки	8,0±1,2	15,8±2,0*	6,1±0,9*
		ГЛК	6,5±0,4	12,3±0,4*	4,2±0,2*
		Микроокружение клеток <i>t. mucose</i>	4,4±0,6	7,5±0,9*	3,1±0,1
	СТ	Тучные клетки	11,1±1,7	18,8±2,5*	7,6±0,7*
		ГЛК	13,4±0,8	19,5±1,3*	8,1±0,3*
		Микроокружение клеток <i>t. mucose</i>	6,5±0,8	14,2±1,2*	3,2±0,2*
Подслизистая основа	КА	Тучные клетки лимфоидного узелка	3,9±0,4	6,8±0,5*	2,2±0,1*
		Внутриузелковые ГЛК	7,1±0,5	11,2±0,6*	5,3±0,2*
		Микроокружение внутриузелковых клеток	2,7±0,3	3,6±0,3	1,1±0,1*
	СТ	Береговые макрофаги	9,0±0,8	9,7±0,7	6,7±0,2*
		Микроокружение береговых макрофагов	4,5±0,1	5,6±0,1	2,2±0,1*
		Тучные клетки лимфоидного узелка	5,8±0,6	9,9±0,7*	3,1±0,1*
Центр размножения лимфоидных узелков КА, СТ	КА	Внутриузелковые ГЛК	10,4±1,8	15,7±1,4*	7,5±0,2*
		Микроокружение внутриузелковых клеток	4,6±0,5	6,6±0,6*	2,1±0,1*
		Береговые макрофаги	13,7±0,9	15,7±1,1	9,7±0,3*
	СТ	Микроокружение береговых макрофагов	6,5±0,2	8,2±0,1	3,3±0,1*
		Клеточные диффероны	56,4±2,6	117,8±2,8*	1,3±0,02*

Срок	Экспрессия Ki-67 в <i>t. s/mucosa</i> лимфоидных фолликулов		Экспрессия Ki-67 в <i>t. mucosa</i> крипт	
	интактные	аллопересадка	интактные	аллопересадка
40 мин	43,0±0,2	60,0±0,2*	36,0±0,2	58,0±0,2*
2 ч	43,0±0,2	16,0±0,1*	36,0±0,2	13,0±0,1*

Через 2 ч после аллопересадки костного мозга в собственной пластинке *t. mucosa* крипт *appendix vermiformis* выявлено уменьшение числа тучных клеток по сравнению с крысами 2-х месячного возраста, содержание катехоламинов и серотонина в этих клетках также понизилось. В гранулярных люминесцирующих клетках отмечено дальнейшее уменьшение их числа, содержание катехоламинов и серотонина в них уменьшилось (табл. 1).

Аналогичные изменения отмечались в лимфоидных узелках *t. s/mucosa*, где число тучных и гранулярных клеток уменьшилось, содержание катехоламинов и серотонина в них снизилось по сравнению с молодыми крысами.

Через 2 ч после аллопересадки костного мозга клеточные диффероны распались, в центре размножения лимфоидных узелков определялись единичные люминесцирующие и тучные клетки. Содержание в них катехоламинов и серотонина было небольшим.

Заключение

Таким образом, определяются морфо-функциональные клетки – гранулярные люминесцирующие и тучные клетки, способствующие синтезу биогенных аминов и способствующие поддержанию нейромедиаторного гомеостаза в клетках *appendix vermiformis* после аллотрансплантации костного мозга. Эти клетки активно реагируют на патологические изменения в *appendix vermiformis* изменением уровня содержания биогенных аминов.

При аллотрансплантации в *t. mucosa* крипт, *t. s/ mucosa* лимфоидного узелка отмечался рост числа гранулярных люминесцирующих и тучных клеток, с увеличением в них содержания катехоламинов и серотонина. Тучные клетки в лимфоидном узелке располагались как по периферии, так и внутри центра размножения. Гранулярные люминесцирующие клетки располагались преимущественно по периферии герминативного центра. Также увеличивалось число внутриузловых гранулярных люминесцирующих и тучных клеток, с одновременным увеличением в них биогенных аминов. По литературным данным известно, что гранулярные люминесцирующие и тучные клетки синтезируют биогенные амины в определенные фазы клеточного цикла. При этом, вышедшие биогенные амины из клеток в межклеточное пространство, оказывают свое влияние на пролиферацию клеток [1,2,3,10,11]. Как было вы-

явлено более ранними работами [2,4,8] в красном костном мозге через 40 мин после аллотрансплантации костного мозга отмечаются супрессивные процессы в основных нейромедиаторных клетках, однако в *appendix vermiformis*, преимущественно в лимфоидных узелках, гранулярные люминесцирующие и тучные клетки продолжают активно синтезировать биогенные амины. Только к 2-м часам эти процессы постепенно подвергаются изменениям.

Полученные данные подтверждаются иммуногистохимическим исследованием, где выявляется высокий уровень пролиферативной активности в клетках как в собственной пластинке *t. mucosa* крипт, так и в лимфоидных узелках *appendix vermiformis* до 40 мин эксперимента [3]. Однако через 2 ч пролиферативная активность клеток снижается, на что указывает низкая экспрессия Ki-67 позитивных клеток как в *t. mucosa*, так и в *t. s/mucosa* лимфоидных узелков (табл. 2).

При иммуногистохимической реакции к маркеру клеточной пролиферации Ki-67 отмечаются неоднозначные изменения в *t. mucosa* и *t. s/mucosa* *appendix vermiformis* у молодых животных и после аллопересадки костного мозга. Морфологически клетки, позитивно экспрессируемые белок Ki-67, характеризуются округлой и овальной формой с разной степенью окраски ядер.

Через 40 мин после аллопересадки костного мозга у опытных крыс по сравнению с интактной происходило увеличение числа пролиферирующих клеток в собственной пластинке *t. mucosa* крипт в 1,3 раза ($p<0,05$) и *t. s/mucosa* лимфоидных узелков – в 1,4 раза ($p<0,05$).

Через 2 ч после аллопересадки костного мозга количество экспрессирующих Ki-67 клеток значительно снизилось в обеих структурно-функциональных зонах, причем в наибольшей степени – в *t. s/mucosa* лимфоидных узелков (табл. 2).

Таблица 2

Экспрессия Ki-67 в клетках *appendix vermiformis* у интактных крыс и после аллопересадки костного мозга%

Примечание:

* уровень статистической значимости различий, $p<0,05$.

Литература | References

1. Агафонкин С. А. Исследование биогенных аминов и биаминосодержащих структурах костного мозга человека при нарушении гемопоэза / С. А. Агафонкин // автореф. дис...канд. мед. наук. М., 2006. 25с.
Agafonkin S. A. The study of biogenic amines and bi-amine-containing bone marrow structures person with a violation of hematopoiesis / S. A. Agafonkin // author. dis ... cand. med. sciences. M., 2006. 25p.
2. Быков В. Л. Секреторные механизмы и секреторные продукты тучных клеток // Морфология. 1999. Т. 115. № 2. С. 64–72.
Bykov V. L. Secretory mechanisms and secretory mast cell products. Morphology. 1999. Vol. 115, no. 2, pp. 64–72.
3. Воробьева О. В. Изменение структур червеобразного отростка, содержащих биогенные амины, после аутотрансплантации костного мозга // Морфология. 2016. Т. 150. № 6. С. 55–58.
Vorobyeva O. V. Changes in the appendix structures containing biogenic amines after bone marrow autotransplantation. Morphology. 2016, V. 150, No. 6, pp. 55–58.
4. Воробьева О. В. Динамика морфо-функционального состояния клеточных дифференнов костного мозга как органа кроветворения // Журнал анатомии и гистопатологии. 2017. Т. 6. № 2. С. 26–30.
Vorob'eva O. V. Dynamics of the Morphofunctional State of Bone Marrow Cell-Differons as a Hematopoietic Organ. Zurnal anatomii i gistopatologii. 2017, Vol. 6, No. 2, pp. 26–30.
5. Каприна А. Д., Старинский В. В., Петрова Г. В. Состояние онкологической помощи населению России в 2016 году. М.: Статсборник, 2017. 236 с.
Kaprina A. D., Starinsky V. V., Petrova G. V. The state of cancer care for the population of Russia in 2016. M.: Statsbornik, 2017. 236 p.
6. Любовцева Е. В., Любовцева Л. А. Биоаминсодержащие структуры костного мозга при системных заболеваниях крови // Морфология. 2012. Т. 141. № 3. С. 95–96.
Lyubovtseva E. V., Lyubovtseva L. A. Bio amine containing bone marrow structures in systemic blood diseases. Morphology. 2012, V. 141, No. 3, pp. 95–96.
7. Falck B., Hillarp N. A., Thieme G., Torp A. Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde // Histochem. Cytochem. 1962. Vol. 10. P. 348–354.
8. Hueber A. J., Asquith D. L., Miller A. M. Mast cells express sil-17 A // J Immunol. 2010. Vol. 184. P. 3336–40.
9. Thomas E. D. Bone marrow transplantation // J. Immunol. 1994. Vol. 39. P. 339–345.
10. Vitetta L, Chen J, Clarke S. The vermiform appendix: an immunological organ sustaining a microbiome inoculum // Clin Sci (Lond). 2019. Vol. 133. № 1. P. 1–8. doi: 10.1042/CS20180956.
11. Wei CK, Chang CM, Lee CH. Acute appendicitis in organ transplantation patients: a report of two cases and a literature review. Ann Transplant. 2014. Vol. 23. № 19. P. 248–52. doi: 10.12659/AOT.890418.