

УДК 616.419–089.819.843: [611.018.2:612.428]

Оригинальная статья

ВЛИЯНИЕ АЛЛОПЕРЕСАДКИ КОСТНОГО МОЗГА НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ТУЧНЫХ КЛЕТОК В ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛАХ

В. О. Романов — ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И. Н. Ульянова, аспирант кафедры общей и клинической морфологии и судебной медицины; **О. В. Воробьева** — ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И. Н. Ульянова, доцент кафедры общей и клинической морфологии и судебной медицины, кандидат медицинских наук; **Л. П. Романова** — ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И. Н. Ульянова, доцент кафедры дерматовенерологии с курсом гигиены, кандидат биологических наук.

INFLUENCE OF BONE MARROW TRANSPLANT ON THE FUNCTIONAL STATE OF MAST CELLS IN LYMPH NODES

V. O. Romanov — I. N. Ulianov Chuvash State University, Postgraduate Student of Department of General and Clinical Morphology and Forensic Medicine; **O. V. Vorobeva** — I. N. Ulianov Chuvash State University, Associate Professor of Department of General and Clinical Morphology and Forensic Medicine, PhD; **L. P. Romanova** — I. N. Ulianov Chuvash State University, Associate Professor of Department of Dermatovenereology with the Course of Hygiene, PhD.

Дата поступления — 02.12.2020 г.

Дата принятия в печать — 26.05.2021 г.

Романов В. О., Воробьева О. В., Романова Л. П. Влияние аллопересадки костного мозга на функциональное состояние тучных клеток в лимфатических узлах. Саратовский научно-медицинский журнал 2021; 17 (2): 226–230.

Цель: проанализировать функциональное состояние тучных клеток (ТК) после аллопересадки костного мозга на ранних сроках эксперимента. **Материал и методы.** Эксперименты проведены на 40 беспородных крысах-самцах, которых разделили на три группы: 1-я группа — интактные ($n=10$); 2-я — контрольные животные, которым вводили 0,85%-го раствора хлорида натрия ($n=10$); 3-я — опытные ($n=30$), которым под эфирным наркозом в хвостовую вену вводили клеточную суспензию от другой крысы. Методом окраски полихромным толуидиновым синим по Унна оценивали состояние тучных клеток. **Результаты.** Через 40 мин после введения чужеродного костного мозга в мозговом веществе около сосудов встречаются метахроматичные тучные клетки, их количество (60%) преобладает над ортохромными (40%). Тучные клетки чаще всего располагаются группами, особенно около сосудов, контактируют между собой. Изменяются морфометрические параметры тучных клеток (диаметр — 8,00–17,00, у интактных — 6,00–12,00 мкм). Через два часа после эксперимента по степени сульфатированности гепарина выявляются преимущественно метахроматичные тучные клетки, их количество составляет 92%, и преобладают активно дегранулированные тучные клетки (61%), $p<0,05$. Изменяются размеры тучных клеток (диаметр — 3,00–9,00 мкм; расстояние между клетками — 29,00–53,00). Однофакторный дисперсионный анализ установил, что существует достоверное влияние срока эксперимента на изменение доли тучных клеток с метахроматическим окрашиванием. **Заключение.** Введение чужеродного костного мозга существенно изменяет функциональный профиль тучных клеток.

Ключевые слова: трансплантация костного мозга, лимфатические узлы, тучные клетки.

Romanov VO, Vorobeva OV, Romanova LP. Influence of bone marrow transplant on the functional state of mast cells in lymph nodes. Saratov Journal of Medical Scientific Research 2021; 17 (2): 226–230.

Purpose: to analyze the functional state of mast cells (MC) after bone marrow allografting in the early stages of the experiment. **Material and Methods.** The experiments were carried out on 40 outbred male mice, which were divided into 3 groups: 1st group — intact ($n=10$); 2nd — control animals, which were injected with 0.85% sodium chloride solution ($n=10$); 3rd group was experienced ($n=30$), who received a cell suspension from another mouse under ether anesthesia into the tail vein. The state of mast cells was assessed by the method of staining with polychrome toluidine blue according to Unna. **Results.** 40 minutes after the introduction of bone marrow analog in the medulla, metachromatic mast cells are found near the vessels, their percentage (60%) prevails over orthochromic (40%). Mast cells are predominantly located in groups, especially near the vessels, in contact with each other. The morphometric parameters of mast cells change (diameter, 8.00–17.00, in intact ones — 6.00–12.00 μm). Two hours after the experiment, according to the degree of sulfation of heparin, mainly metachromatic mast cells are detected, their percentage is 92% and actively degranulated mast cells (61%), $p<0.05$, predominate. The size of mast cells changes (diameter — 3.00–9.00 μm ; distance between cells — 29.00–53.00). One-way analysis of variance found that there is a significant effect of the experiment period on the change in the proportion of mast cells with metachromatic staining. **Conclusion.** The introduction of bone marrow transplant significantly changes the functional profile of mast cells.

Keywords: bone marrow transplantation, lymph nodes, mast cells.

Введение. Лимфатическая система — неотъемлемая часть сосудистой системы организма [1–4]. Одни из основных структурных компонентов лимфатической системы — лимфатические узлы, представляющие собой важное звено путей циркуляции лимфы и являющиеся периферическими органами кроветворной и иммунной систем. Изучение органов лимфатической системы на клеточном уровне, при действии различных факторов, позволяет выявить степень их морфологических изменений в ответ на конкретное воздействие [1–4].

Одними из структур, активно участвующих в процессах иммунитета и кроветворения, являются ТК, расположенные по септам и около сосудов, и поэтому именно к их изучению в последние годы приковано пристальное внимание исследователей [5–7]. За более чем столетний период исследования ТК появилось большое число фундаментальных данных, обобщение которых позволило описать их основные функции: ТК участвуют в образовании межклеточного вещества путем синтеза сульфатированных гликозаминогликанов; синтезируют, депонируют и путем экзоцитоза выделяют биогенные амины, которые влияют на микроокружение, тем самым осуществляют регуляцию местного гомеостаза [3]. Функциональное состояние ТК зависит от наличия секретлируемых ими биологически активных веществ. Различают преформированные медиаторы ТК, к которым принадлежат гистамин, серотонин, гликозаминогликаны (гепарин и хондроитинсульфаты), а также ферменты (трипаза, химазы и др.) [1–4]. Как известно, вещества из ТК выделяются диффузией или дегрануляцией. Встречается несколько типов дегрануляции ТК: постепенная, когда наблюдается селективное выделение медиаторов из гранул ТК — этот тип секреции, очевидно, является необходимым для осуществления регуляции физиологических процессов, направленных на поддержание гомеостаза; быстрая дегрануляция, возникающая путем экзоцитоза, в этом случае гранулы сливаются между собой и с мембраной клетки, что приводит к ускоренному выбросу медиаторов. Такой тип дегрануляции возникает на любые изменения, возникающие в организме [2–5]. В связи с тем в первую очередь необходимо изучить состояние ТК в лимфатических узлах на экспериментальное воздействие извне на организм. Мы, с помощью окраски полихромным толуидиновым синим по методу А. Унна, оценивали состояние ТК в условиях введения чужеродного антигена.

Цель — проанализировать функциональное состояние ТК после аллопересадки костного мозга на ранних сроках эксперимента.

Материал и методы. Опыты проводились на 40 беспородных крысах-самцах, которых разделили на три группы: 1-я группа — интактные ($n=10$); 2-я — контрольные животные, которым вводили 0,85% раствора хлорида натрия ($n=10$); 3-я — опытные ($n=20$), которым под эфирным наркозом в хвостовую вену вводили клеточную суспензию от другой крысы. Методика: 1 мл костного мозга извлекали из эпифиза бедренной кости у крысы, смешивали с 2 мл 0,85%-го раствора натрия хлорида. Затем 1 мл полученной суспензии вводили в хвостовую вену другой крысы. Под эфирным наркозом извлекали шейные лимфатические узлы через 40 мин, 2, 4 ч от начала экспе-

римента. Для гистологического исследования лимфатические узлы фиксировали в 10%-м нейтральном формалине. После гистологической проводки материал заливали в парафин, готовились серийные срезы толщиной 5 мкм на ротационном микротоме Accu-Cut SRM 200, затем окрашивали толуидиновым синим по методу Унна [3]. По степени окраски ТК оценивали их состояние: α -ортохромная окраска характерна для несурфатированного (незрелого) гепарина; чернильно-синяя — для β -метахроматичного; пурпурная окраска — для γ -метахроматичного (зрелого) гепарина. Изучали морфометрические параметры ТК (диаметр, мкм; расстояние (мкм) между ТК). Представление о количественном распределении ТК дает метод подсчета их в пяти полях зрения микроскопа при увеличении об. 40 ок. 10. Гистологические препараты изучали с помощью микроскопа Leica DM4000B с цветной фотокамерой Leica DFC 425 и лицензионной программой Leica Application Suite 3.8.0.

Статистический анализ проведен в программе Statistica 6,0 (StatSoft, США). Материалы исследования подвергались статистической обработке с использованием стандартных методов параметрической и непараметрической статистики. Характер распределения установлен с помощью критерия Колмогорова — Смирнова с поправкой Лиллиефорса. Для описания данных использовались такие стандартные статистические показатели, как среднее и стандартное отклонение ($M \pm \sigma$). Так как распределение в некоторых исследуемых выборках отличалось от нормального, применялись критерии непараметрической статистики. Для сравнения средних значений двух независимых выборок использовали непараметрический U -критерий Манна — Уитни. Значимыми считали различия при $p < 0,05$. В случае наличия существенной разницы между сроками в целом попарные сравнения средних значений имеющихся сроков (40 мин, 2 и 4 ч) осуществляли с помощью теста Тьюки. Взаимосвязи между сроком и параметрами ТК оценивали с использованием непараметрического рангового корреляционного анализа Спирмена. Чем ближе модуль коэффициента корреляции к единице, тем более сильно является связь между измеряемыми величинами. Проводили однофакторный дисперсионный анализ, где в качестве фактора использовался срок эксперимента.

Исследования соответствовали положениям Европейской конвенции по защите позвоночных животных, требованиям национального руководства по содержанию и уходу за лабораторными животными и проводились при одобрении этического комитета медицинского факультета «Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова» (протокол № 5/8 от 18 июня 2015 г.).

Результаты. У 2-й — контрольной группы животных, которым вводили 0,85%-го раствора хлорида натрия ($n=10$), — выявлены изменения в морфометрических показателях ТК до 30 мин после эксперимента. Далее показатели были идентичны с данными интактных животных. В связи с этим срок эксперимента у 3-й группы животных был взят за 40-й мин.

При изучении лимфатических узлов интактных животных с помощью метода Унна выявлено, что ортохромную окраску имеют корона лимфоидных узелков (фолликулов) и диффузно расположенные межузелковые лимфоциты. Выявляется два вида лимфоидных узелков: поверхностные, у которых окрашиваются реактивные центры, и глубже лежащие узелки, у которых центральная часть не окраши-

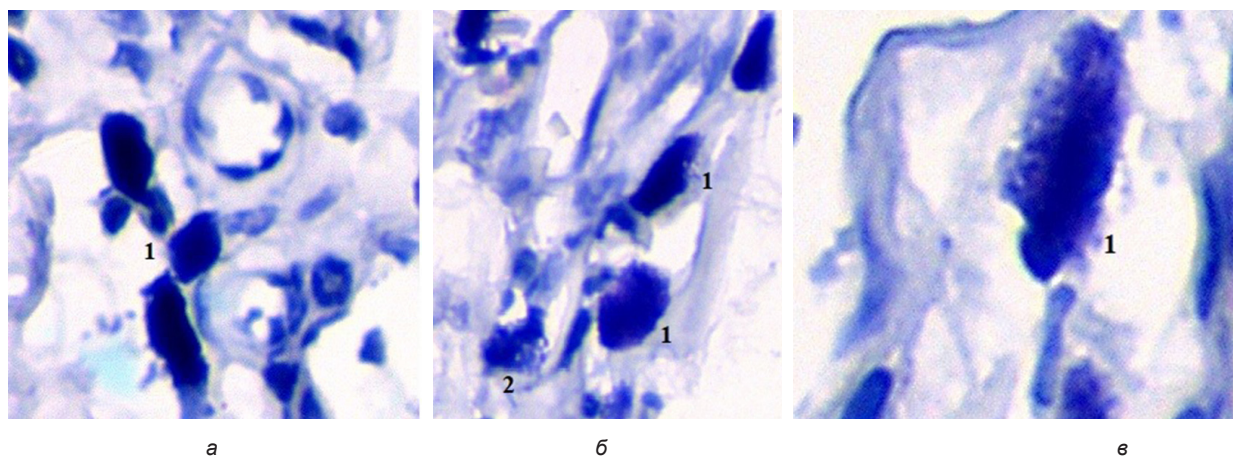


Рис. 1. Морфофункциональные особенности тучных клеток у интактных животных. Метод Унна. Микроскоп Leica DM4000B. Ув. $\times 900$: а — цельные тучные клетки (1), расположенные около сосуда; б — цельная (1) и слабо дегранулированная тучная клетка (2); в — слабо дегранулированная тучная клетка (1)

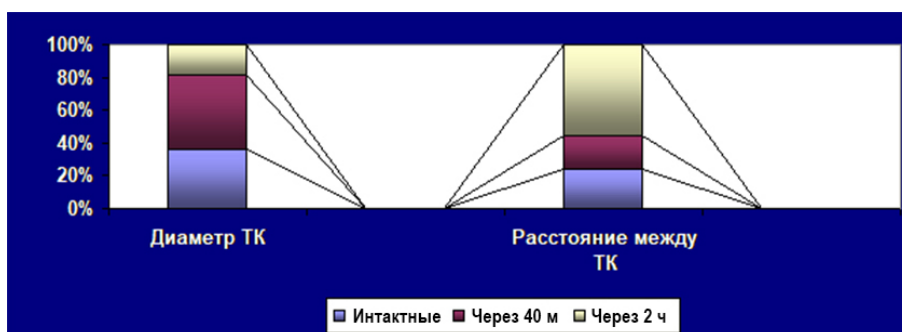


Рис. 2. Диаметр тучных клеток и расстояние между тучными клетками у интактных животных после аллопересадки костного мозга, мкм: ТК — тучные клетки

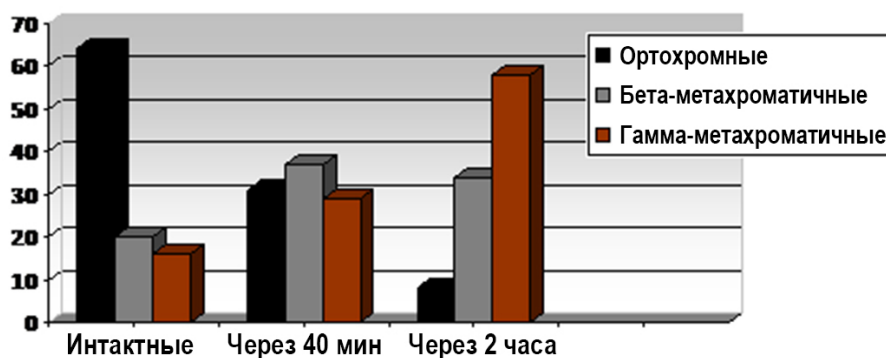


Рис. 3. Степень сульфатированности (%) тучных клеток у интактных животных и после аллопересадки костного мозга

вается. В реактивном центре положительных клеток на гепарин не выявляется. В параортальной зоне и мягкотных шнурах выявляются положительные на гликозаминогликаны лимфоциты.

ТК в лимфатическом узле выявляются с разной степенью метахромазии: ортохромные $64 \pm 1,4\%$, β -метахроматичные — $20 \pm 1,8\%$, γ -метахроматичные — $16 \pm 0,9\%$. Преобладающим типом клеток являются недегранулированные и слабо дегранулированные (рис. 1).

При исследовании лимфатических узлов через 40 мин после аллопересадки костного мозга выявляется их ортохромная окраска. Резко увеличивается число макрофагов. В капсуле, по септам и в мозговом веществе около сосудов встречаются

ортохромные и метахроматичные ТК. ТК чаще всего располагаются группами, в некоторых местах, особенно около сосудов, контактируют между собой. Изменяются морфометрические параметры ТК (рис. 2). По степени метахромазии преобладают ТК с высоко сульфатированным гепарином (рис. 3).

Через 40 мин после аллопересадки костного мозга встречаются ТК с разной степенью дегрануляции (рис. 4), причем доля умеренно и активно дегранулированных ТК преобладает над недегранулированными (рис. 5; таблица). Достоверные различия в размерах клетки выявляются в ТК, имеющих ортохромную окраску (в 1,28 раза, при $p < 0,001$), и в ТК, в которых ядра не определяется (в 1,19 раза, $p < 0,001$).

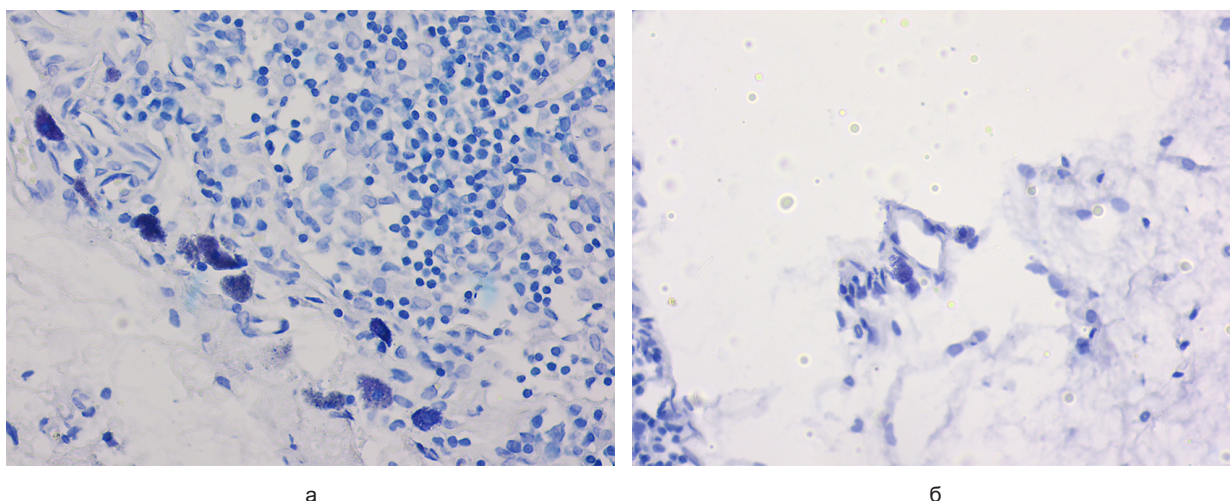


Рис. 4. β -метахроматичные тучные клетки через 40 мин после аллопересадки костного мозга. Метод Унна. Микроскоп Leica DM4000B. Ув. $\times 900$: а — слабо дегранулированные; б — дегранулированные

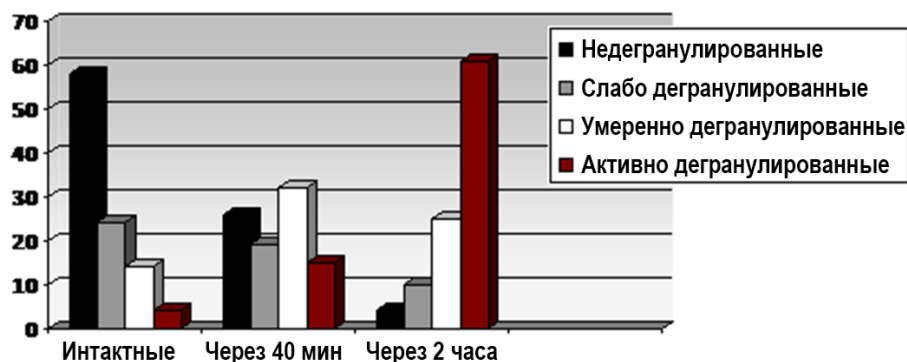


Рис. 5. Тучные клетки с разной степенью дегрануляции (%) у интактных животных и после аллопересадки костного мозга

Тучные клетки с разной степенью дегрануляции у интактных животных и после аллопересадки костного мозга, $M \pm \sigma$, %

Степень дегрануляции	Интактные животные	Через 40 мин после аллопересадки костного мозга	Через два часа после аллопересадки костного мозга
Недегранулированные	$58 \pm 2,4$	$26 \pm 1,7^*$	$4 \pm 1,2^*$
Слабо дегранулированные	$24 \pm 1,9$	$19 \pm 1,1^*$	$10 \pm 1,1^*$
Умеренно дегранулированные	$14 \pm 0,8$	$32 \pm 0,9^*$	$25 \pm 1,9^*$
Активно дегранулированные	$4 \pm 0,3$	$15 \pm 0,9^*$	$61 \pm 1,6^*$

Примечание: * — различия с интактной группой статистически значимы ($p < 0,05$).

Через два часа после аллопересадки костного мозга в паракортикальной зоне лимфатического узла появляются резидентные макрофаги. По степени сульфатированности гепарина выявляются преимущественно метахроматичные ТК (рис. 4). ТК встречаются с разной степенью дегрануляции, причем доля умеренно и активно дегранулированных ТК преобладает над недегранулированными (рис. 5, таблица).

С помощью однофакторного дисперсионного анализа выявлено существенное влияние срока после аллопересадки костного мозга на изменение доли ТК с метахроматической окраской. Корреляционный анализ Спирмена установил наличие достоверной сильной положительной взаимосвязи ($r = 0,83$; $p < 0,05$) между такими параметрами, как срок и изменение процента дегранулированных ТК.

Обсуждение. Таким образом, возрастание процента ТК с активной степенью дегрануляции свидетельствует об активном участии ТК на введение клеточного антигена. Примечательно, что ТК определялись недостаточно зрелыми, на что указывает изменение их размеров. Введение чужеродного костного мозга приводит к увеличению синтеза высокосульфатированных гликозаминогликанов, наличие которых прямо пропорционально степени метахромазии ТК. Выявлено увеличение доли дегранулированных ТК, при чем их процент увеличивается со сроком эксперимента и преобладающими клетками являются активно дегранулированные ТК. Очевидно, что ТК являются клетками, реагирующими на введение чужеродного антигена путем их дегрануляции и последующим распадом. Как известно, ТК обладают способностью регулировать содержание

биоогенных аминов в межклеточном пространстве с помощью синтеза множества активных веществ: серотонина, катехоламинов, гистамина, оксида азота, гепарина, протеолитических ферментов [1, 2, 4–6]. Необходимо отметить, что встречаемые контакты ТК между собой и расположение их около сосудов имеют несомненное значение для осуществления функционального потенциала клеток, что очевидно указывает на существование регуляторной системы в формировании местного гомеостаза.

Заключение. Выявленные увеличение активности ТК лимфатического узла на фоне введения чужеродного костного мозга и изменение их тинкториальных свойств с увеличением доли метакроматических ТК, повышением степени их дегрануляции и изменением морфометрических характеристик существенно модифицируют функциональный профиль ТК, что указывает на активное участие ТК при введении чужеродного антигена.

Конфликт интересов не заявляется.

References (Литература)

1. Vorobeva OV, Lyubovtseva LA, Gur'yanova EA. Serotonin-Containing Cells in the Primary Hemopoietic Organ after an Autologous Bone Marrow Transplantation. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2019; 168 (9): 355–8. Russian (Воробьева О.В., Любовева Л.А., Гурьянова Е.А. Серотонинсодержащие клетки в первичном органе кроветворения после аутологичной пересадки костного мозга. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2019; 168 (9): 355–8).
2. Lyubovtseva LA, Lyubovtseva EV, Vorobeva OV. Age-Related and Species Differences in Neuroamine Thymic Structures in Rats, Cats and Humans. In: *Current Issues of Clinical Medicine: The Regional Scientific and Practical Conference (for*

the 65th Anniversary of the Budget Institution of the Chuvash Republic "Second City Hospital" in Cheboksary), *Proc. Sci. and Pract. Conf. Cheboksary: Chuvash University Publ.*, 2017; p. 177–84. Russian (Любовева Л.А., Любовева Е.В., Воробьева О.В. Возрастные и видовые различия нейроаминных структур тимуса крыс, кошек и человека. В кн.: *Актуальные вопросы клинической медицины: сб. материалов регион. науч.-практ. конференции (к 65-летию бюджетного учреждения Чувашской Республики «Вторая городская больница» г. Чебоксары)*. Чебоксары: Чуваш. гос. ун-т им. И.Н. Ульянова, 2017: с. 177–84).

3. Bauer HZ. Mikroskopisch-chemischer Nachweis von Glykogen und einigen anderen Polysacchariden. *Z mikrosk-anat Forsch* 1933; (33): 143–60.

4. Moskovskij AV, Lezhenina SV, Urukov JuN, Moskovskaja OI. The Morphofunctional State of Bioamines-Containing Structures of the Dental Pulp in Combined Pathology. *Contemporary Problems of Science and Education* 2020; 53 (2): 109. DOI: 10.17513/spno. 29615. Russian (Московский А.В., Леженина С.В., Уруков Ю.Н., Московская О.И. Морфофункциональное состояние биоаминсодержащих структур пульпы зуба при сочетанной патологии. *Современные проблемы науки и образования* 2020; 53 (2): 109. DOI: 10.17513/spno. 29615).

5. Romanova LP, Malyshev II, Vorobeva OV. Physiological Blood Indicators in Rats after a Mechanical Liver Injury against the Background of Using Biologically Active Substances. *Bulletin of the Chuvash State Teachers-Training University n. a. I.Y. Yakovlev* 2010; 68 (4): 167–71. Russian (Романова Л.П., Малышев И.И., Воробьева О.В. Физиологические показатели крови у крысят после механической травмы печени на фоне применения биологически активных веществ. *Вестник Чувашского государственного педагогического университета им. И.Я. Яковлева*. 2010; 68 (4): 167–71).

6. Shvedavchenko AI. The patterns of Anatomy and Topography of Lymph Nodes. *Morphological Bulletin* 2006; (1-2): 190–2. Russian (Шведавченко А.И. Закономерности анатомии и топографии лимфатических узлов. *Морфологические ведомости* 2006; (1-2): 190–2).