

Ферментативная обеспеченность клеток костного мозга после аутотрансплантации

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

ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова»,
Чебоксары, Россия

Цель исследования – оценить активность и локализацию ферментов в клетках костного мозга после аутотрансплантации.

Материал и методы. Эксперименты проведены на 40 мышах-самцах, которым проводили ауто-трансплантацию костного мозга. Под эфирным наркозом из эпифизов мышей извлекали 1 мл костного мозга, разводили в 2 мл изотонического раствора, далее 1 мл полученной взвеси вводили в хвостовую вену этим же мышам. Изготавливали мазки и отпечатки, которые исследовали гистохимическим методом по Гленнеру для выявления моноаминоксидазы, методом Гомори изучали кислую фосфатазу, а сукцинатдегидрогеназу исследовали по Г. Лабори в клетках костного мозга. Статистическая обработка материала проводилась в программе «Statistica 6.0».

Результаты. Через 40 мин после аутотрансплантации отмечается увеличение активности ферментов в тучных, гранулярных, некоторых гемопоэтических клетках костного мозга, причем существенное повышение отмечается в тучных и гранулярных клетках. Выявляются два вида клеток: эндокриноподобные и один из видов макрофагов. Происходит увеличение кислой фосфатазы в некоторых гемопоэтических клетках, обладающих макрофагальными свойствами. Увеличивается активность сукцинатдегидрогеназы, что свидетельствует о повышении активности окислительного фосфорилирования, и приводит к повышению продукции аденозинтрифосфата, осуществляется энергетическое обеспечение клеток костного мозга.

Заключение. Выявлено, что в некоторых клетках костного мозга аутотрансплантация приводит к повышению активности ферментов: моноаминоксидазы, сукцинатдегидрогеназы, кислой фосфатазы.

Ключевые слова: костный мозг, моноаминоксидаза, кислая фосфатаза, сукцинатдегидрогеназа, гранулярные клетки, тучные клетки.

© O. V. Vorob'eva, L. A. Lyubovtseva, N. E. Gimaldinova, 2018

I.N. Ulianov Chuvash State University, Cheboksary, Russia

Enzymatic Provision of Bone Marrow Cells After Autotransplantation

The purpose of the study is assessment of enzymes' activity and localization in bone marrow cells after autotransplantation.

Material and methods. Experiments were performed on 40 male mice that underwent bone marrow autotransplantation. Under ether anesthesia 1 ml of bone marrow was extracted from mice epiphyses, then were diluted in 2 ml of isotonic solution, after that 1 ml of obtained suspension was injected into the caudal vein of the same mice. Smears and imprints were produced and studied using Glenner's histochemical method to identify monoamine oxidase, using Gomory's method for acid phosphatase and for succinate reductase in bone marrow cells using H. Laborit method. Statistical processing of the material was carried out in the program «Statistica 6.0».

Results. In 40 min after autotransplantation an increase in enzymatic activity in mast cells, granular, some hematopoietic bone marrow cells is noted, with significant increase observed in mast cells and granular cells. Two types of cells are identified: endocrine-like and one of macrophagal types. There is an increase in acid phosphatase in some hematopoietic cells with macrophagal properties. The activity of succinate dehydrogenase increases, indicating elevated activity of oxidative phosphorylation, resulting in increased production of ATP, the energy supply of bone marrow cells is carried out.

Conclusion. It is revealed that in some bone marrow cells autotransplantation results in increased activity of enzymes: monoamine oxidase, succinate reductase and acid phosphatase.

Key words: bone marrow, monoamine oxidase, acid phosphatase, succinate reductase, granular cells, mast cells.

Введение

За последние десятилетия в области трансплантологии достигнуты большие успехи, однако, остается множество проблем, связанных с развитием посттрансплантационных осложнений. Особое место принадлежит изменению внутриклеточного ферментного состава в органе реципиента, что приводит к функциональным нарушениям в клетках [1, 3,

5]. В связи этим, мы исследовали некоторые ферменты после аутотрансплантации костного мозга (КМ). Среди большого спектра ферментов, важное значение имеет моноаминоксидаза (МАО), которая расщепляет нейромедиаторы, стабилизируя их содержание в межклеточном пространстве [1]. Кислая фосфатаза (КФ) является протеолитическим ферментом, сукцинатдегидрогеназа (СДГ) – ферментом, одновременно участвующим в деятельности

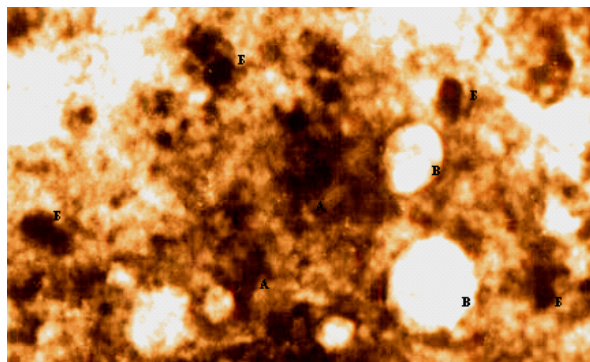


Рис. Распределение моноаминоксидазы в мазке костного мозга. Обозначения: А – гранулярная клетка; Б – тучная клетка; В – липоцит. Метод окраски по Гленнеру. Ув. 400.

митохондриальной цепи цикла Кребса, т.е. осуществляет энергетическое обеспечение клеток.

Целью исследования является оценка активности и локализации ферментов в клетках КМ после аутотрансплантации КМ.

Материал и методы исследования

Эксперименты проведены на 40 мышак-самцах, которые были получены из вивария ФГБОУ ВО «ЧГУ им. И.Н. Ульянова». Содержание животных и все манипуляции проводились в соответствии с основными этическими правилами с «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» [9], согласно стандарту идентичному международному документу OECD Test № 421 «Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test» [4], согласно рекомендациям «Про правовые, законодательные и этические нормы и требования при выполнении научных морфологических исследований» [6]. Мышей разделили на 2 группы – контрольную (n=20) и экспериментальную (n=20). Под эфирным наркозом из эпифизов мышей извлекали 1 мл КМ, разводили в 2 мл изотонического раствора, далее 1 мл полученной взвеси костномозговых клеток вводили в хвостовую вену этим же мышам. После передозировки эфирным наркозом, соблюдая «Методические рекомендации по выводу лабораторных животных из эксперимента», у мышей отделяли бедренную кость, из эпифиза изготавливали мазки и отпечатки.

Гистохимическим методом по Гленнеру выявляли МАО [10], локализацию в клетках определяли по распределению продукта реакции – зерен формазана. В препаратах, окрашенных с применением методики выявления МАО, определяли изменение оптической плотности светового пучка по формуле

$$D = \lg I_0 / I,$$

где I_0 – интенсивность потока света, прошедшего через участок препарата со слабовыра-

женной активностью фермента (микроокружение), I – поток света, прошедшего через участок препарата с сильно выраженной активностью фермента. КФ в клетках костного мозга выявляли методом Гомори [7]. СДГ изучали по Г. Лабори [7]. Активность СДГ определяли по образовавшимся в результате реакции зернам формазана, число которых прямо пропорционально активности этого фермента. Статистическую обработку проводили в «Statistica 6.0», с применением непараметрического критерия Вилкоксона Манна–Уитни.

Результаты и их обсуждение

У intactных мышей МАО определяется в гранулярных (ГК) и тучных клетках (ТК), малых лимфоцитах КМ, кроме некоторых видов бластных форм клеток и липоцитов, где этот фермент определяется в тонком ободке цитоплазмы (рис.).

В КМ МАО содержат также мегакариоциты и эозинофилы. Небольшое количество МАО содержится в моноцитах и клетках нейтрофильного ряда. У дегранулированных ТК имеется небольшое количество гранул формазана, т.е. можно утверждать, что активность этого фермента минимальна. МАО выявляется в адвентиции сосудистых стенок, где локализуются нервные волокна. КФ у intactных мышей содержится в цитоплазме клеток с фагоцитарной активностью: нейтрофильном, эозинофильном, моноцитарном рядах. КФ также содержат банальные амёбовидные макрофаги с бобовидным ядром, макрофаги – дендритные клетки, многоотростчатой формы, у которых отростки распространяются на несколько полей зрения и формируют контакт с лимфоцитами. СДГ выявляется в большинстве гемопоэтических клеток, в наибольшем количестве определяется в митохондриях около ядра и мембраны (табл.). Предположительно, это указывает на то, что для клеток характерна подвижность, которую обеспечивают микротубулы, расположенные по периферии цитоплазмы клеток, для которых необходима энергия.

Через 40 мин после аутотрансплантации у мышей опытной группы активность МАО увеличивается в ГК, по морфологическим признакам их можно отнести к эндокриноподобным. Эти клетки крупнее всех остальных, кроме мегакариоцитов, имеют гранулы разного размера и разной интенсивности окраски. Интенсивность окраски на МАО также увеличивается в некоторых ТК, эозинофилах, исключение составляют лимфоциты (табл.). Выявляются на МАО нервные волокна, частота встречаемости которых увеличивается по сравнению с intactными животными.

Через 40 мин после аутотрансплантации у животных опытной группы КФ обнару-

Таблица

Активность ферментов в клетках костного мозга после аутооттрансплантации (у. е.)

Название структуры	Моноаминоксидаза (по методу Гленнера)			Сукцинатдегидрогеназа (по методу Г. Лабори)		
	Интакт- ные жи- вотные	Аутооттрансплантация		Интакт- ные жи- вотные	Аутооттрансплантация	
		40 мин	2 ч		40 мин	2 ч
Гранулярные клетки	0.69±0.2	0.81±0.3	0.89±0.3	0.52±0.1	0.57±0.1	0.69±0.1
Тучные клетки	0.59±0.2	0.79±0.3	0.81±0.3	0.51±0.1	0.54±0.1	0.64±0.1
Ретикулоциты	0.10±0.1	0.12±0.1	0.15±0.1	0.12±0.1	0.13±0.1	0.23±0.1
Миелобласты	0.21±0.1	0.21±0.1	0.31±0.1	0.11±0.1	0.12±0.1	0.15±0.1
Сегментоядерные эозинофилы	0.40±0.1	0.50±0.1	0.60±0.1	0.31±0.1	0.40±0.1	0.44±0.1
Метамиелоциты нейтрофильные	0.41±0.1	0.50±0.1	0.67±0.1	0.40±0.1	0.51±0.1	0.57±0.1
Нейтрофилы (палочкоядерные)	0.51±0.2	0.57±0.1	0.60±0.1	0.31±0.1	0.42±0.1	0.50±0.1
Нейтрофилы (сегментоядерные)	0.51±0.2	0.58±0.2	0.63±0.2	0.30±0.1	0.45±0.1	0.52±0.1
Лимфоциты	0.2±0.1	0.30±0.1	0.35±0.1	0.21±0.1	0.22±0.1	0.36±0.1
Мегакариоциты	0.71±0.1	0.90±0.1	0.94±0.1	0.50±0.1	0.61±0.1	0.66±0.1

Примечание: * – различия достоверны по сравнению с группой интактных животных при $p < 0.01$.

живается в цитоплазме клеток нейтрофильных, эозинофильных, моноцитарных рядов и некоторых видах больших лимфоцитов. Увеличивается интенсивность окраски в моноцитах, что свидетельствует об их активном функционировании. При реакции на КФ выявляются два вида КФ-позитивных гранулярных клеток: крупные клетки овальной формы, у которых определяются гранулы разной интенсивности окраски; клетки, имеющие разные размеры и многоотростчатую форму, у которых число гранул колеблется от 12 до 16, гранулы изоморфны. Предположительно, это разные виды макрофагов, возможно дендритные и интердигетирующие.

Через 40 мин после аутооттрансплантации КМ СДГ в наибольшем количестве содержат ГК, ТК, ретикулярные клетки, эозинофилы, моноциты, полихроматофильные эритроциты, лимфоциты, нервные волокна.

Через 2 часа происходит еще большее увеличение активности ферментов в ГК, ТК, некоторых гемопоэтических клетках костного мозга (табл.).

Заключение

В последнее время считается целесообразным комплексное исследование активности и локализации ферментов, что позволяет оценить состояние не только макрофагальной активности, но и энергетических процессов в клетке. Наши исследования позволили установить, что после аутооттрансплантации происходит увеличение активности моноаминоксидазы в эндокриноподобных клетках костного мозга, причем значимое повышение отмечается в гранулярных и тучных клетках. Как известно, гранулярные и тучные клетки являются интегративным звеном в регуляции нейроминного обмена, что было выявлено в более ранних наших исследованиях [2, 5]. По

данным некоторых исследователей, увеличение активности моноаминоксидазы происходит вслед за увеличением нейроминных [1, 2, 8]. Исходя из наших данных [2, 3, 5], при аутооттрансплантации происходит накопление нейроминных в перечисленных клетках, вслед за этим происходит увеличение моноаминоксидазы. Также происходит увеличение активности кислой фосфатазы в некоторых гемопоэтических клетках, обладающих макрофагальными свойствами. Увеличивается активность сукцинатдегидрогеназы, что очевидно, свидетельствует о повышении активности окислительного фосфорилирования, и приводит к повышению продукции АТФ, осуществляется энергетическое обеспечение клеток костного мозга [8].

Таким образом, в ходе исследования выявлены особенности ферментативного обмена в клетках костного мозга после аутооттрансплантации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

1. Волчегорский И. А. Динамика активности моноаминоксидазы В и ферментов антиоксидантной защиты головного мозга в процессе постнатального развития человека. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2006; 142 (8): 158–166.
2. Воробьева О. В. Динамика морфофункционального состояния клеточных дифференцированных костного мозга как органа кроветворения. Журнал анатомии и гистопатологии. 2017; 6(2): 26–29.
3. Гималдинова Н. Н. Влияние ауто- и изогенной пересадки костного мозга на нейромедиаторные структуры тимуса: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Саранск; 2007. 12 с.

4. Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации (ЕАСС). Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Испытания по оценке репродуктивной / эмбриональной токсичности (скрининговый метод). М., 2013. 18.
5. Любовева Л. А. Люминесцентно-гистохимическое исследование аминоксодержащих структур костного мозга, тимуса и крови при действии нейромедиаторов и антигенов. Чебоксары: Изд-во ЧГУ, 1993. 100.
6. Мишалов В. Д., Чайковский И. В., Твердохлеб Ю. Б. О правовых, законодательных и этических нормах и условиях при выполнении научных морфологических исследований. Морфология. 2007; 1(2): 108–115.
7. Пирс Э. Гистохимия теоретическая и прикладная. Пер. с англ. Москва; 1962; 964.
8. Brooks P. S. A shortcut to mitochondrial signaling and pathology: A commentary on «Nonenzymatic formation of succinate in mitochondria under oxidative stress». Free Radical Biology and Medicine. 2006; 41: 41–45.
9. European convention for the protection of vertebrate animals used for experim. and other scientific purposes. Coun. of Europe, Strasbourg; 1986. 53.
10. Glenner G. G. The histochemical demonstration of monoamine oxidase activity by tetrazoliwn salts. J. Histochem. and cytochem. 1957; 5: 591–602.

References

1. Volchegorskii I.A. Dinamika aktivnosti monoaminoksidazy V i fermentov antioksidaznoi zashchity golovnogo mozga v protsesse postnatal'nogo razvitiya cheloveka [Dynamics of activity of monoamine oxidase B and enzymes of antioxidative defense of the brain in the process of postnatal human development]. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2006; 142 (8):158–166 (in Russian).
2. Vorob'eva O.V. Dinamika morfo-funktsional'nogo sostoyaniya kletochnykh differenov kostnogo mozga kak organa krovetvoreniya [Dynamics of the Morphofunctional State of Bone Marrow Cell-Differons as a Hematopoietic Organ]. Journal of Anatomy and Histopathology. 2017; 6(2): 26–29 (in Russian).
3. Gimaldinova N.N. Vliyanie auto- i izogennoi peresadok kostnogo mozga na neiromediatornye struktury timusa: avtoref. dis. ... kand. med. nauk [Effect of auto- and isogenic bone marrow transplants on the neurotransmitter structures of the thymus: Cand.med.sci.diss.abs.]. Saransk; 2007. 12s (in Russian).
4. Evraziyskiy sovet po standartizatsii, metrologii i sertifikatsii (EASS). Metody ispytaniya po vozdeystviyu khimicheskoy produktsii na organizm cheloveka. Ispytaniya po otsenke reproduktivnoy/embrional'noy toksichnosti (skringovyy metod) [Eurasian Council for standardization, Metrology and certification (EASC). Test methods for the effects of chemical products on the human body. Reproductive / embryonic toxicity assessment tests (screening method)]. Moscow, 2013. 18 (in Russian).
5. Lyubovtseva L.A. Lyuminescentno-gistokhimicheskoe issledovanie aminoksozhashchikh struktur kostnogo mozga, timusa i krovi pri deistvii neiromediatorov i antigenov [Luminescent-histochemical study of amino-containing structures of the bone marrow, thymus and blood under the action of neurotransmitters and antigens]. Cheboksary; 100 (in Russian).
6. Mishalov V. D., Chaikovskii I. V., Tverdokhlebyu. B. O pravovykh, zakonodatel'nykh i eticheskikh normakh i usloviyakh pri vypolnenii nauchnykh morfologicheskikh issledovaniy [On legal, legislative and ethical standards, and conditions, performing morphological scientific studies]. Morfologiia. 2007; 1(2): 108–115 (in Russian).
7. Pirs E. Gistokhimiya teoreticheskaya i prikladnaya [Histochemistry theoretical and applied]. Per. s angl. Moscow; 1962. 964 (in Russian).
8. Brooks P.S. A shortcut to mitochondrial signaling and pathology: A commentary on «Nonenzymatic formation of succinate in mitochondria under oxidative stress». Free Radical Biology and Medicine. 2006; 41: 41–45.
9. European convention for the protection of vertebrate animals used for experim. and other scientific purposes. Coun. of Europe, Strasbourg; 1986. 53.
10. Glenner G.G. The histochemical demonstration of monoamine oxidase activity by tetrazoliwn salts. J. Histochem. and cytochem. 1957; 5: 591–602.

Сведения об авторах

Воробьева Ольга Васильевна – доцент кафедры общей и клинической морфологии и судебной медицины ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова». 428010, Чувашская Республика, г. Чебоксары, Московский пр-т, 15. E-mail: olavorobeve@mail.ru

Любовева Любовь Алексеевна – профессор кафедры общей и клинической морфологии и судебной медицины ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова». 428010, Чувашская Республика, г. Чебоксары, Московский пр-т, 15.

Гималдинова Наталья Евгеньевна – доцент кафедры общей и клинической морфологии и судебной медицины ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова». 428010, Чувашская Республика, г. Чебоксары, Московский пр-т, 15.

Поступила в редакцию 3.07.2018 г.

Для цитирования: Воробьева О.В., Любовева Л.А., Гималдинова Н.Е. Ферментативная обеспеченность клеток костного мозга после аутотрансплантации. Журнал анатомии и гистопатологии. 2018; 7(3): 9–12. doi: 10.18499/2225-7357-2018-7-3-9-12.

For citation: Vorob'eva O.V., Lyubovtseva L.A., Gimaldinova N.E. Enzymatic provision of bone marrow cells after autotransplantation. Journal of Anatomy and Histopathology. 2018; 7(3): 9–12. doi: 10.18499/2225-7357-2018-7-3-9-12.