

2. Косяков П.Н., Зотиков Е.А., Туманов А.К., Уманова М.А. Группы крови/ Большая медицинская энциклопедия. М.: Медицина. 1977. Т.6. С.491-503.
3. Морозова О.А. Роль эндогенных факторов в развитии сидиоза: Автореф. дисс... канд.мед.наук. Барнаул, 1994. 18с.
4. Татишвили Н.И., Меунаргия В.В., Соселия Т.С. Молекулярные и клеточные аспекты иммунологического распознавания. Тбилиси: Менширеба, 1988. 227с.

УДК 616-43:616-612.603

А.П.Ястребов, С.В.Двиренко, С.В.Сазонов

ТУЧНЫЕ КЛЕТКИ, ПРОТЕОГЛИКАНЫ И ИНДУЦИРОВАННЫЙ ГЕМОПОЭЗ

Уральская государственная медицинская академия

Многочисленными экспериментами, выполненными в лабораториях Уральской медицинской академии было доказано участие протеогликанов (гликозаминогликанов - ГАГ) в регуляции гемопоэза, а также регенераторных процессов в других тканях при действии на организм экстремальных факторов [7,9,10]. Анализ накопленного в последнее время собственного экспериментального и литературного материала позволил детализировать роль протеогликанов и гликопротеинов в формировании гемопоэз-индуцированного микроокружения, в межклеточных взаимодействиях, в механизмах действия гемопоэтинов на клетки-мишени [6,7,11,16,19]. Вместе с тем, малоизученным остается вопрос о механизмах изменения содержания и качественного состава протеогликанов. Очевидно, что содержание протеогликанов в ткани зависит от соотношения их образования и деградации. Последнее осуществляется преимущественно за счет лизосомальных ферментов, поступающих во внеклеточное пространство при активации лизосомального аппарата. Лизосомам принадлежит определенная роль в индукции пролиферации и развитии регенераторного ответа в тканях, в том числе и в костном мозге [3].

Известно, что протеогликины синтезируются в различных клетках. В костном мозге это прежде всего мегакариоциты, тромбоциты, полиморфноядерные лейкоциты [7,15]. Однако, рассматривая протеогликины как регуляторный фактор, представляется маловероятным его образование в клетках, на которые этот регуляторный фактор должен оказать направленное действие. Логичнее ожидать участие других, негемопоэтических клеток в направленном изменении содержания протеогликанов в костном мозгу. Такую роль

могут играть прежде всего тучные клетки. Известные своими большими запасами протеогликанов в гранулах [13,14]. В костном мозге крыс обнаружено значительное число тучных клеток, которые расположены непосредственно между клеточными элементами миелоидной ткани [8]. Доказательства роли тучных клеток в регуляции процессов физиологической регенерации в тканях с высокой и низкой скоростями клеточного обновления были представлены нами ранее [10].

Целью данной работы явился анализ возможного участия тучных клеток в изменениях содержания протеогликанов в костном мозге при индукции гемопоэза.

Методы и материалы. Эксперименты выполнены на крысах линии Вистар массой 200г. Индукцию регенераторных процессов в гемопоэтической ткани красного костного мозга вызывали кровопусканием из яремной вены в размере 2% от массы животного. Активность гемопоэза оценивали по показателям периферической крови, определяемым общепринятыми методами. В костном мозге подсчитывали количество кариоцитов на бедро-миелограмму. Активность синтеза ДНК в клетках костного мозга определяли по включению ³H-тимидина методом жидкостной сцинтилляции. По количеству миелокариоцитов, меченых ³H-тимидином на радиоавтографах, вычисляли долю клеток, находящихся в S-фазе. Содержание кислых ГАГ определяли по методу Bitter M., Muir H. [12], нейтральных ГАГ - методом Warren L. [18]. На срезах красного костного мозга подсчитывали количество тучных клеток, индекс их дегрануляции, измеряли клеточные размеры, изучали тинкториальные свойства, определяли содержание кислых гликозаминогликанов [5] в клетках цитофлуориметрическим способом [1]. Учитывая, что тучные клетки в гемопоэтической ткани располагаются неравномерно [8] все исследования тучных клеток проводились в зоне наиболее активного кроветворения - в диафизе, непосредственно под эндостом. Значения показателей сравнивали с таковыми у интактных животных.

Результаты исследования. Индукция регенераторных процессов в красном костном мозге у крыс вызывает изменения на всех основных уровнях системы кроветворения. В периферической крови животных через 1 сутки после кровопотери уровень гемоглобина снижается на 28,2% с последующим постепенным подъемом уровня его значений к 7 суткам (табл. 1).

Прирост этого показателя к третьим суткам составляет 17,1%, к пятым суткам - 20,6% и к седьмым - 27,4% по сравнению с уровнем 1 суток.

Динамика гематологических показателей у крыс после кровопотери

Таблица 1

Показатели	Контроль	Сроки после кровопотери (сут)			
		1	3	5	8
Гемоглобин (Г/л)	172,3±5,0	123,7±4,5*	144,8±4,5*	149,3±2,9*	157,6±3,4
Эритроциты(Т/л)	7,2±0,2	5,6±0,2*	6,2±0,3*	6,2±0,2*	-
Ретикулоциты (%)	3,1±0,3	5,4±0,9*	8,6±1,3*	9,1±1,1*	7,4±1,2
Лейкоциты(Г/л)	9,9±0,7	15,7±1,8*	14,1±1,37*	12,9±1,5	-

Примечание: * - обозначены достоверно различающиеся показатели

Одновременно с гемоглобином уменьшается в периферической крови количество эритроцитов. На первые сутки после кровопотери их число снижается на 22,2%, с последующим ростом значений этого показателя. Обратная зависимость наблюдается при исследовании динамики числа ретикулоцитов. В периферической крови их число в первые сутки увеличивается на 74,2% к третьим суткам - на 177,4%, к пятым - на 193,5% по сравнению с значениями этого показателя у контрольной группы животных. К седьмым суткам происходит снижение числа ретикулоцитов по сравнению с предыдущими сроками после кровопотери, однако их количество в крови остается к седьмым суткам на 138,7% выше. Подобные же изменения обнаружены в

использованной экспериментальной модели и при изучении числа лейкоцитов. Однако, для последних характерен максимальный подъем показателей на первые сутки после кровопотери, с постепенным уменьшением их числа в крови. Уже к пятым суткам рост этого показателя достоверно не отличается от его значений у контрольных животных.

В костном мозгу общее количество миелокарицитов оставалось постоянным и достоверно уменьшается только на седьмые сутки. Однако, при анализе ростков кроветворения выявляются значительные количественные различия (табл. 2). Так, число лимфоидных клеток уже к первым суткам после проведения кровопотери уменьшается

Таблица 2

Динамика изменения числа клеток разных ростков кроветворения после кровопотери (10⁶/бедро)

Показатели	Контроль	Сроки после кровопотери (сут)			
		1	3	5	7
Миелокарициты	124,5±4,7	119,6±9,6	125,2±5,7	123,0±6,1	104,5±6,0*
Эритрокарициты	31,0±2,1	32,0±1,9	45,0±1,8*	47,4±4,1*	35,0±4,2
Гранулоцитарные клетки	47,9±3,1	37,4±3,9	44,7±4,0	34,1±3,4*	23,6±2,2*
Лимфоидные клетки	35,6±0,7	30,5±3,8	25,3±1,6*	27,7±1,5*	35,4±1,8

Таблица 3

Динамика изменения активности синтетических процессов в ростках кроветворения после кровопотери (10⁶/бедро)

Показатели	Контроль	Сроки после кровопотери (сут)			
		1	3	5	7
Миелокарициты	9,1±0,5	9,2±0,4	10,5±0,9	12,0±0,5*	12,3±0,9*
Эритромиелоциты	3,5±0,6	5,1±0,2*	6,2±1,0*	6,3±0,7*	6,4±0,4
Гранулоцитарные клетки	1,9±0,3	0,6±0,1*	0,6±0,1*	1,2±0,4	0,5±0,1*
Лимфоидные клетки	3,7±0,6	3,5±0,5	3,7±0,3	4,5±0,1	5,4±0,9

на 14,3%, к третьим и пятым суткам продолжается уменьшение их количества (на 29,9 и 22,2% соответственно) с увеличением значений этого показателя до контрольного уровня к седьмым суткам. Достаточно сложная, стадийная динамика изменения числа клеток прослеживается при подсчете количества гранулоцитарных клеток. После некоторого снижения на первые сутки после воздействия к третьим суткам их число уже не

отличается от уровня контроля. Однако к пятым и седьмым суткам количество гранулоцитов вновь резко уменьшается на 28,8 и 50,7% соответственно от уровня контрольных значений. Число же эритрокарицитов, напротив, увеличивается на 45,2% к третьим суткам, сохраняется на этом уровне до пятых суток и снижается к седьмым суткам наблюдения.

Изучение синтетических процессов в

красном костном мозгу показало, что включение меченого предшественника в ДНК миелокариоцитов увеличилось в 5,2 раза уже к первым суткам и в 10,0 раз к третьим суткам, с сохранением этого уровня до пятых суток и с некоторым уменьшением значений этого показателя к окончанию исследования (табл. 3). Однако вклад в индукцию синтетических процессов со стороны разных ростков кроветворения значительно отличается. В первые трое суток не обнаружено изменений состояния процессов синтеза ДНК в лимфоидных клетках. В более поздние сроки происходит некоторое, статистически недостоверное увеличение числа синтезирующих клеток. Количество гранулоцитарных клеток, синтезирующих ДНК во все сроки, изученные после кровопотери, оказалось достоверно ниже уровня контрольных значений. Число же эритромиелоцитов, принимающих участие в процессах синтеза, оказалось увеличенным, начиная уже с первых суток после кровопотери. В этот срок в костном мозге у крыс количество указанных клеток оказалось на 45,7% больше, чем у контрольных животных. К третьим суткам значение этого показателя увеличилось на 77,1%, к пятым суткам - на 80,2% и к седьмым - на 82,9% от уровня контрольных показателей.

Развитие регенераторного ответа после кровопотери сопровождается динамическими изменениями содержания ГАГ в кроветворной ткани (табл.4). Количество нейтральных ГАГ заметно снижается в первые часы после операции, а через 1 и 3 суток увеличивается на 60,4 и 44,2 % соответственно. Изменения содержания кислых ГАГ были более выраженные. Через 2 часа после кровопотери отмечалось повышение на 12,7 % , через 1 сутки - резкое снижение (-85,9%) и через трое суток вновь увеличение на 59,0%.

Количественные люминесцентно-гистохимические исследования показали, что протеогликаны в красном костном мозгу определяются как в клетках, так и в межклеточном веществе ткани, однако преимущественно сосредоточены в тучных клетках (табл.5).

Концентрация ГАГ за пределами указанных клеток оказалась в 9,2 раза ниже. После кровопотери их содержание в цитоплазме снижается на 46,6% в первые и на 18,1% в третьи сутки. В более поздние сроки значения этого показателя возвращаются к контрольному уровню. Одновременно отмечаются колебания концентрации кГАГ в основном (межклеточном) веществе миелоидной ткани.

Таблица 4

Влияние кровопотери на содержание гликозаминогликанов в костном мозге

Гликозаминогликаны	Контроль	Сроки после кровопотери, сутки		
		2 часа	1	3
Кислые	136,2±4,3	153,5±3,9*	19,2±5,1*	216,5±6,4*
Нейтральные	24,0±1,8	17,6±1,0*	38,5±1,7*	34,6±1,8*

Таблица 5

Содержание протеогликанов в тучных клетках и межклеточном веществе костного мозга после кровопотери (в усл.ед.)

Показатели	Контроль	Сроки после кровопотери, сутки			
		1	3	5	8
В клетках	24,9±0,70	13,3±0,34*	20,4±0,67*	23,1±0,85	22,9±0,56
В межклеточном веществе	3,6±0,21	2,8±0,18*	10,1±0,64*	10,8±0,64*	5,6±0,32

Таблица 6

Изменения тучных клеток костного мозга после кровопотери

Показатели	Контроль	Сроки после кровопотери, сутки			
		1	3	5	8
Число (/мм ²)	44,0±1,63	48,8±1,87	65,5±2,60*	60,3±2,38*	66,3±2,28*
Размеры (мкм ²)	261,1±8,04	459,9±4,70*	475,3±5,62*	369,8±4,14*	419,1±7,82*
Число дегранулированных клеток	4,6±0,57	12,3±0,78*	9,8±0,65*	8,3±0,65*	5,0±0,53*

Так, при некотором незначительном (на 22,3%) первоначальном уменьшении содержания кГАГ в этом компоненте микроокружения, через трое суток после кровопотери их концентрация увеличивается в 2,8 раза, на пятые сутки - в 3,0 раза, с последующим снижением до уровня контрольных значений к восьмым суткам. В этих же клетках, одновременно, происходит уменьшение содержания гистамина. В первые сутки эксперимента его концентрация максимально снижается на 49,4% ($p < 0.05$), сохраняется на этом уровне к третьим суткам (-44,6% $p < 0.05$), с последующим постепенным повышением содержания гистамина в цитоплазме тучных клеток до контрольных значений.

В ранние сроки после кровопотери, на фоне стимуляции пролиферативных процессов в миелоидной ткани начинает увеличиваться число тучных клеток (табл.6). Через 1 сутки их оказалось больше на 10,9%, к третьим суткам - на 48,8%. Обнаруженное увеличение их числа сохраняется до окончания эксперимента. Одновременно с изменением количества тучных клеток в миелоидной ткани после кровопотери увеличиваются их размеры. Уже к первым суткам площадь клеток увеличилась на 76,1% с последующим сохранением уровня этого показателя до окончания исследования. Среди тучных клеток на первые сутки после индукции регенераторных процессов в миелоидной ткани увеличилось в 2,6 раза число дегранулированных форм. В дальнейшем отмечается постепенное уменьшение доли этих клеток. К 8 суткам частота встречаемости дегранулированных тучных клеток не превышает уровня контрольных значений.

Обсуждение результатов. Активация регенераторных процессов в костном мозге после кровопотери у крыс в объеме 2% от массы тела затрагивает в основном эритроидный росток. При этом пролиферативные процессы в гранулоцитарном ростке угнетаются, а в лимфоидном - отмечается стимуляция в поздние сроки (пятые сутки). Регенераторный ответ в костном мозге развивается на фоне стимуляции функционального состояния тучных клеток во все исследованные сроки, о чем свидетельствует увеличение их числа, размеров и доли дегранулированных форм. Выброс гранул из тучных клеток сопровождается поступлением в межклеточное вещество значительного количества протеогликанов, являющихся основным их компонентом [2,13]. Однако этот процесс не приводит к увеличению содержания протеогликанов во внеклеточном пространстве в ранние сроки после кровопотери. Более того, количество протеогликанов вне клеток, а также их общее содержание заметно снижается. Повидимому одновременно с увеличением освобождения протеогликанов усиливается процесс их деградации. Наиболее вероятно, что

это связано с активацией лизосомального аппарата клеток костного мозга. Через 1 сутки после кровопотери наблюдается увеличение на 40,2% ($p < 0.05$) доли свободной активности кислой фосфатазы (рис. 1), что отражает лабильзацию лизосомальных мембран и связанное с этим освобождение гидролитических ферментов.

Последующая стабилизация лизосомальных мембран (третьи сутки) и снижение их проницаемости (пятые сутки) совпадает по времени с увеличением общего количества протеогликанов в ткани и в межклеточном веществе. Таким образом, концентрация протеогликанов в ткани определяется соотношением активности их образования, секреции и деградации. Достоверное увеличение суммарного содержания кислых ГАГ в костном мозге на фоне неизменной активности лизосомального аппарата (2 часа и трое суток после кровопотери) свидетельствует об увеличении продукции протеогликанов тучными клетками костного мозга при индукции гемопоэза.

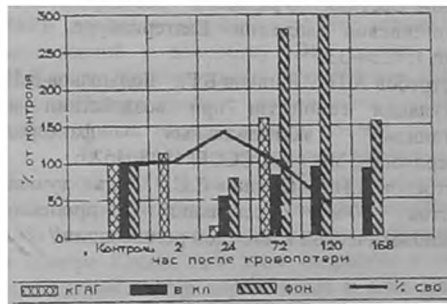


Рис.1. Изменения содержания протеогликанов и состояния лизосомального аппарата в костном мозге крыс после кровопотери.

По оси ординат - процент от контрольного уровня значения показателя, по оси абсцисс - время после кровопотери. Условные обозначения: кГАГ - кислые гликозамингликаны, в кл. - кГАГ в тучных клетках, фон - кГАГ в межклеточном веществе, % сво - процент свободной активности кислой фосфатазы.

Установленный механизм расшифровывает роль тучных клеток в изменении содержания протеогликанов при индукции регенераторных процессов в кроветворной ткани.

ЛИТЕРАТУРА

1. Козинец Г.И., Котельников В.М., Гольдберг В.Е. Цитофотометрия гемопоэтических клеток. Томск: Изд-во Томского ун-та. 1986. 224 с.
2. Проценко В.А., Шпак С.И., Доценко С.М. Тканевые базофилы и базофильные гранулоциты крови. М.: Медицина. 1987. 128 с.
3. Савельев Л.И. Состояние лизосомального аппарата и перекисного окисления липидов при воздействии на организм экстремальных

- факторов: Автореф. дис. канд. мед. наук. Челябинск, 1989. 21 с.
4. Цвиренко С.В., Шаравара А.А., Юшков Б.Г., Ястребов А.П. О роли гликозаминогликанов костного мозга в реакции кроветворной ткани при экстремальных воздействиях//Бюл. exper. биол. и мед. 1990. Т. 60. № 7. С. 29-30.
 5. Шубич М.Г., Могильная Г.М. Гликопротеины и протеогликаны. Принципы их гистохимического анализа//Арх.анат., 1979. Т.77, Вып.8. С. 92-99.
 6. Харченко М.Ф., Рыбакова Л.П., Голенко О.Д., Корнилова Н.В., Захаров Ю.М. Роль гликозаминогликанов и протеогликанов в гемопоэзе и физиологических функциях клеток крови// Физиол.ж. 1996. Т. 82, № 5. С. 18-25.
 7. Юшков Б.Г., Попов Г.К., Северин М.В., Ястребов А.П. Гликопротеиды и гемопоэз. Екатеринбург: Изд. УрГМИ, 1994. 127 с.
 8. Юшков Б.Г., Сазонов С.В. Некоторые особенности структурной организации и функциональная гетерогенность кроветворной ткани//Вестник Уральской государственной медицинской академии. Екатеринбург. 1995. Вып.1. С.30-33.
 9. Ястребов А.П., Юшков Б.Г., Большаков В.Н. Регуляция гемопоэза при воздействии на организм экстремальных факторов. Свердловск: УрО АН СССР, 1988. 152 с.
 10. Ястребов А.П., Сазонов С.В. Роль тучных клеток в регуляции процессов физиологической клеточной регенерации// Вестник Уральской государственной медицинской академии. Екатеринбург. 1995. Вып.1. С.42-48.
 11. Atkins F.M., Friedman M.M., Subba Rao P.V., Metcalfe D.D. Interactions between mast cells, fibroblasts and connective tissue component//Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 1985. V.77. № 1. P.96-102.
 12. Bitter T., Muir H. A modified uronic acid carbanyle reaction//Anal.Biochem. 1962. V.4. №4. P.217-228.
 13. Bloom C. Structural and biochemical characteristics of mast cells. /In: The inflammatory process. New-York, 1974. V.1, P.545-568.
 14. Irani A.M., Schwartz L.B. Human mast cell heterogeneity// Allergy Proc. 1994. 15(6). P. 303-308.
 15. Minguell J.J., Tavassoli M. Proteoglycan synthesis by hematopoietic progenitor cells//Blood. 1989. V.73. P.1821-1827.
 16. Roberts R., Gallagher J., Spooncer E. et al Heparan sulphate bound growth factors: a mechanism for stromal hemopoiesis//Nature. 1988. V.332. № 6162. P.376-378.
 17. Schwartz L.B. Mast cells: function and contents// Curr.Opin.Immunol. 1994. 6(1). P. 91-97.
 18. Warren L. The thiobarbituric acid assay of sialic acids// J.Biol.Chem. 1959. V.234. №8. P.1971-1975.
 19. Wight T.N., Kinsella M.G., Keating A., Singer J.W. Proteoglycans in human long-term bone marrow cultures: biochemical and ultrastructural analysis//Blood. 1986. V.67. № 5. P.1333-1343