

ЯСТРЕБОВ

Анатолий

Петрович

Заведующий кафедрой патологической физиологии УГМА, Заслуженный деятель науки РФ, академик РАЕН, доктор медицинских наук, профессор

САЗОНОВ

Сергей

Владимирович

Заведующий кафедрой гистологии УГМА, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ УЧАСТИЯ ТУЧНЫХ КЛЕТОК В РЕГУЛЯЦИИ ПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ В ГЕМОПОЭТИЧЕСКОЙ ТКАНИ

В настоящее время благодаря исследованиям, проводимым в нашей лаборатории, сформировались основные представления об участии протеогликанов в регуляции гемопоэза, их роли в формировании гемопоэзиндуцирующего микроокружения и межклеточных взаимодействиях [6, 7]. Вместе с тем оставался открытым вопрос об источниках поступления и механизмах регуляции содержания ГАГ в межклеточном веществе. Известно, что последние синтезируются в различных клетках. В костном мозге наиболее часто эта роль отводится мегакариоцитам, тромбоцитам, полиморфноядерным лейкоцитам, липоцитам, эндотелиальным клеткам [6]. Однако, как было установлено при сравнительных количественных цитофлуориметрических исследованиях содержания кислых гликозаминогликанов (кГАГ) в нашей лаборатории, тучные клетки являются одним из основных их источников в костном мозге [10].

В более ранних работах нами было показано, что морфофункциональное состояние тучных клеток в органе связано с активностью пролиферативных процессов в его основной ткани [8]. Так, в костном мозге крыс с высокой скоростью пролиферативных процессов обна-

*Возрастные особенности участия тучных клеток в регуляции
пролиферативных процессов в гемопоэтической ткани*

ружено значительное число тучных клеток, которые расположены непосредственно между клеточными элементами миелоидной ткани.

Целью данной работы явился анализ возможных механизмов регуляции гемопоэза, связанных с изменениями содержания кГАГ в костном мозге, в том числе и при старении организма.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Состояние пролиферативных процессов оценивали с помощью метода проточной ДНК-цитометрии [14] с одновременным рас-пределением клеток по периодам митотического цикла, расчетом их временных параметров, оценкой величины митотического индекса. Индукцию регенераторных процессов в костном мозге проводили путем выполнения животным острой кровопотери, которую вызывали путем извлечения крови из яремной вены в объеме 2% от массы животного. Нормобарическую гипоксию продолжительностью 1 ч ежедневно вызывали в течение двух недель [3]. Содержание кГАГ определяли цитофлуориметрическим способом с помощью комплекса ЛЮАМ И-3 (ЛОМО).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Тучные клетки и процессы физиологической регенерации в миелоидной ткани. Изучение процессов физиологической регенерации в настоящее время невозможно без учета их возрастных особенностей. Нами было показано [9], что при старении организма в красном костном мозге происходит уменьшение величины пролиферативного пула клеток за счет снижения активности процессов синтеза ДНК. Анализ временных параметров митотического цикла указывает механизм уменьшения клеток в синтетическом периоде цикла — в клеточной популяции не изменяется время прохождения клетками S-периода, а замедляется выход клеток в синтетическую фазу, так как происходит их задержка в премитотическом периоде цикла.

В красном костном мозге крыс при старении обнаружены существенные изменения со стороны основных показателей, характеризующих тучные клетки (табл. 1). В группе старых животных, по сравнению с зрелыми, значительно (в 10 раз; $P < 0,001$) увеличивается число тучных клеток, расположенных между клеточными элементами миелоидной ткани. При этом возрастает доля более мелких форм

тучных клеток, что приводит к уменьшению их средних размеров (на 26,2%; $P < 0,01$). Одновременно в 2,2 раза ($P < 0,001$) увеличивается доля дегранулированных тучных клеток, абсолютное количество которых у старых животных больше в 22,3 раза ($P < 0,001$).

Таблица 1

Особенности тучных клеток в костном мозге крыс из разных возрастных групп

Группа животных	Показатели			
	Содержание в 1 мм ² ткани	Дегранулированные		Размеры клеток, мкм ²
		в 1 мм ²	%	
Зрелые	44,0±1,63	7,9±0,83	18,0	261,1±8,04
Старые	442,0±176,0*	176,0±70,4*	40,0	192,8±20,44*

Примечание: * при $P < 0,05$

Тучные клетки и индуцированный гемопоэз. Действие нормобарической гипоксии на организм животных из разных возрастных групп выявило особенности их реагирования на этот экстремальный фактор. Используемый режим действия гипоксии на организм животных не привел к существенным изменениям со стороны основных параметров митотического цикла у зрелых животных. Реакция же на гипоксическое воздействие у старых животных заметно отличалась — действие гипоксии приводит к подъему величины митотического индекса, увеличению пролиферативного пула клеток в миелоидной ткани на 23,5% ($P < 0,05$) за счет роста (на 26,3%; $P < 0,05$) популяции миелокариоцитов, находящихся в синтетическом периоде цикла с соответствующим снижением числа клеток в периоде покоя. Обнаруженные особенности течения пролиферативных процессов в миелоидной ткани у старых животных связаны с уменьшением времени прохождения клетками цикла на 8,1 часов (на 19,0%; $P < 0,05$). Анализ временных параметров цикла показал отсутствие изменений в продолжительности синтетического и премитотического периодов. Продолжительность цикла снижается за счет соответствующего уменьшения времени нахождения клеток в периоде покоя.

Возрастные особенности участия тучных клеток в регуляции пролиферативных процессов в гемопоэтической ткани

При действии на организм гипоксии в обеих изученных возрастных группах обнаружены однонаправленные изменения в популяции тучных клеток (табл. 2). В группе зрелых животных число изучаемых клеток увеличивается в 5,2 раза ($P < 0,001$). Возрастает (в 14,2 раза; $P < 0,001$) и число дегранулированных форм, доля которых среди всех тучных клеток увеличивается в 2,7 раза. Площадь клеток после действия гипоксии на организм уменьшается (на 28,6%; $P < 0,01$). В группе старых животных, подвергавшихся воздействию гипоксии, обнаруженные изменения были менее выражены. Так, число тучных клеток в результате воздействия увеличилось только в 2,4 раза ($P < 0,001$), количество дегранулированных форм в 3,1 раза ($P < 0,01$). Доля же тучных клеток, находящихся в состоянии дегрануляции, у старых животных возросла всего на 25,0%. Не обнаружено изменений и со стороны клеточных размеров.

Таблица 2

Особенности тучных клеток в костном мозге крыс из разных возрастных групп при действии гипоксии на организм

Группа животных	Показатели			
	Содержание в 1 мм ² ткани	Дегранулированные		Размеры клеток, мкм ²
		в 1 мм ²	%	
Зрелые: контрольная опытная	44,0±1,63	7,9±0,83	18,0	261,1±8,04
	229,2±16,5*	112,3±8,09*	49,0	186,4±16,35*
Старые: контрольная опытная	442,0±176,0	176,0±70,4	40,0	192,8±20,44
	1072,5±147,58*	536,3±73,8*	50,0	175,3±73,80

Развитие индуцированного кровопотерей регенераторного ответа сопровождается динамическими изменениями содержания ГАГ в кроветворной ткани. 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 выражены. Через 2 часа после кровопотери отмечается 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 мозге определяются как в клетках, так и в межклеточном веществе ткани, однако преимущественно сосредоточены в тучных клетках (табл. 3). Концентрация кГАГ за пределами указанных клеток оказалась в 9,2 раза ниже.

Таблица 3

Содержание в тучных клетках красного костного мозга кислых гликозаминогликанов и гистамина при кровопотере, определяемое цитофлуориметрическим способом (в усл.ед.)

Определяемое в-во	Контроль	Срок после кровопускания, сутки			
		1	3	5	8
кГАГ					
а) в ТК	24,9±0,70	13,3±0,34*	20,4±0,67*	23,1±0,85	22,9±0,56
б) фон	3,6±0,21	2,8±0,18*	10,1±0,64*	10,8±0,64*	5,6±0,32
Гистамин					
в ТК	8,3±0,37	4,2±0,21*	4,6±0,33*	6,8±0,42*	7,7±0,32

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. 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

*Возрастные особенности участия тучных клеток в регуляции
пролиферативных процессов в гемопоэтической ткани*

число тучных клеток (табл. 4). 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 возрастает 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.

Таблица 4

Изменение тучных клеток костного мозга при кровопотере

Показатели	Контроль	Срок после кровопускания, сутки			
		1	3	5	8
Число ТК (на 1 мм ²)	44,0±1,63	48,8±1,87	65,5±2,60*	60,3±2,38*	66,3±2,28*
Размеры ТК (мкм ²)	261,1±8,04	459,9±4,7*	475,3±5,6*	369,8±4,1*	419,1±7,8*
Число де- гранули- рованных клеток	4,6±0,57	12,3±0,78*	9,8±0,65*	8,3±0,65*	5,0±0,53
%	10,8	18,7	14,8	13,7	7,5

Поддержание популяции зрелых клеток в периферической крови после кровопотери возможно только путем стимуляции, напряжения пролиферативных процессов в компонентах дифферона, расположенных в красном костном мозге. Однако при их исследовании в наших экспериментах показано, что при старении организма в

последнем происходит уменьшение величины пролиферативного пула клеток за счет снижения активности процессов синтеза ДНК [9] и одновременно возрастает число тучных клеток. Таким образом, формирование индуцированного пролиферативного ответа будет развиваться в костном мозге у старых животных на фоне уже измененных реактивности организма и состояния процессов физиологической регенерации.

Индукция регенераторных процессов в костном мозгу при помощи кровопотери позволила выявить значительные отличия в реакциях гемопоэтической ткани у животных из разных возрастных групп. У старых животных величина пролиферативного ответа на кровопотерю оказалась достоверно ниже по сравнению со зрелыми. В формировании волны пролиферации участвовало меньшее число клеток красного костного мозга. При этом не обнаружено достоверного изменения в скорости прохождения клеток через синтетический и премитотический периоды цикла. Основные особенности регенераторных процессов после их индукции в красном костном мозгу, возникающие у животных при их старении, заключаются в замедлении перехода клеток из периода покоя в митотический цикл. Этот механизм и определяет снижение величины пролиферативного ответа на индукцию регенераторных процессов в гемопоэтической ткани у старых животных.

Полученные в проведенных экспериментах результаты позволяют рассуждать тучную клетку как один из важнейших компонентов клеточного микроокружения в костном мозге, принимающую активное участие в регуляции пролиферативных процессов за счет синтеза и секреции биологически активных веществ с разнонаправленными биологическими эффектами. При изучении состояния пролиферативных процессов в гемопоэтической ткани прослеживаются определенные закономерности в соотношении между их активностью и содержанием в ней тучных клеток.

Снижение уровня процессов физиологической регенерации в костном мозге старых животных происходит на фоне значительного увеличения числа тучных клеток и стимуляции их функциональной активности. Эффект воздействия на организм нормобарической гипоксии в этих условиях зависит от возраста животных. Используемый режим не сопровождался подъемом активности пролиферативных процессов в костном мозге зрелых животных. Одновременно

Возрастные особенности участия тучных клеток в регуляции пролиферативных процессов в гемопоэтической ткани

в последнем в несколько раз увеличивается число тучных клеток и активность их дегрануляции. Некоторая стимуляция пролиферативных процессов в костном мозге у старых животных не сопровождается подъемом значений основных показателей даже до контрольного уровня в группе зрелых животных. Одновременно наблюдается дальнейшее увеличение числа и функциональной активности тучных клеток. Таким образом, на фоне ослабления пролиферативных процессов в костном мозге всегда выявляется значительное увеличение количества тучных клеток и возрастает их функциональная активность. Эти результаты позволяют предположить связь тучных клеток с развитием торможения пролиферативных процессов в гемопоэтической ткани. Уточнить роль тучной клетки в регуляции пролиферативных процессов стало возможным после проведения экспериментов в модели индуцированной регенерации. Индукция регенераторных процессов в миелоидной ткани при кровопотере в ранние сроки не сопровождается увеличением числа тучных клеток, но резко возрастает их функциональная активность и стимулируются процессы дегрануляции, что приводит к выбросу из цитоплазмы клеток гранул с содержащимися в них биологически активными веществами. Однако, как показали количественные гистохимические исследования, в ранние сроки после индукции содержание кГАГ в клетках и межклеточном веществе значительно снижается, а гистамина — возрастает. Несмотря на активный выброс гранул, содержащих кГАГ из тучных клеток в межклеточное вещество, 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. По-видимому, одновременно с увеличением освобождения ГАГ усиливается процесс их деградации. Наиболее вероятно, что это связано с активизацией лизосомального аппарата клеток костного мозга. Через 1 сутки после кровопотери наблюдается увеличение на 40,2% ($P < 0,05$) доли свободной активности кислой фосфатазы [10], что отражает лабильность лизосомальных мембран и связанное с этим освобождение гидролитических ферментов. Последующая стабилизация лизосомальных мембран и снижение их проницаемости совпадает по времени с увеличением общего количества протеогликанов и числа тучных клеток в ткани и сопровождается снижением активности пролиферативных процес-

сов в костном мозге. Возможность угнетения процессов клеточного деления с помощью кГАГ показана и в опытах *in vitro* в различных клеточных культурах [1, 12, 13, 16]. Таким образом, стимуляция пролиферативных процессов в гемопоэтической ткани происходит на фоне неизмененного числа тучных клеток, увеличения концентрации в межклеточном веществе гистамина и снижения содержания кГАГ. После прохождения пика пролиферативного ответа на кровопотерю и на фоне снижения активности регенераторных процессов наблюдается увеличение числа тучных клеток и рост концентрации кГАГ в миелоидной ткани.

Анализ полученных результатов позволяет сделать вывод о связи возрастного снижения активности пролиферативных процессов в изученных тканях с увеличением числа и функциональной активности тучных клеток. Проведенные эксперименты показывают их роль не только в регуляции процессов пролиферации и дифференцировки в гемопоэтической ткани, но и их активное участие в регуляции пролиферативных процессов при возрастной инволюции. Полученные данные позволяют выделить тучные клетки как самостоятельный элемент общей системы регуляции клеточного деления, участвующий в условиях развития возрастной инволюции органов в торможении пролиферации через поддержание определенного соотношения концентрации кГАГ и гистамина в ткани.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Голенко О.Д., Байрак Е.Е., Харченко М.Ф.* Ингибирующее действие гликозаминогликанов гранулоцитов крови человека на колониеобразующую способность фибробластов костного мозга // Бюлл.эксперим. биол. мед., 1998. — Т.125. — № 3. — С.319—323.
2. *Клименко Н.А., Дыгай А.М., Гумилевский Б.Ю. и др.* Роль тучных клеток в регуляции эритропоэза при воспалении // Бюлл. эксперим. биол.мед., 1997. — Т.123. — № 6. — С.626—629.
3. *Мещанинов В.Н.* Влияние гипоксии на свободнорадикальное окисление липидов в органах системы крови животных в условиях старения организма // Вестник Уральской государственной медицинской академии. 1997, В. 3. — Екатеринбург: Изд-во УГМА. — С. 16—19.
4. *Проценко В.А., Шпак С.И., Доценко С.М.* Тканевые базофилы и базофильные гранулоциты крови. — М.: Медицина, 1987. — 128 с.

Возрастные особенности участия тучных клеток в регуляции пролиферативных процессов в гемопоэтической ткани

5. Хохлов А.Н. Пролиферация и старение. Общие проблемы физико-химической биологии (Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР). — М., 1988, № 9. — 174 с.
6. Юшков Б.Г., Попов Г.К., Северин М.В., Ястребов А.П. Гликопروتенды и гемопоэз. — Екатеринбург: Изд. УРГМИ, 1994. — 127 с.
7. Ястребов А.П., Юшков Б.Г., Большаков В.Н. Регуляция гемопоэза при воздействии на организм экстремальных факторов. — Свердловск: УрО АН СССР, 1988. — 152 с.
8. 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.
9. Ястребов А.П., Сазонов С.В. Возрастные особенности состояния пролиферативных процессов в миелоидной ткани // В сб.: Вопросы экспериментальной физиологии. — М. — Екатеринбург: Изд-во Уро РАН, 1997. — С. 158–163.
10. Ястребов А.П., Цвиренко С.В., Сазонов С.В. Тучные клетки, протеогликаны и индуцированный гемопоэз // Вестник Уральской государственной медицинской академии. Вып.5. — Екатеринбург: Изд-во УГМА, 1997. — С. 28-33.
11. Burd P.R., Thompson W.C., Max E.E., Mills F.C. Activated mast cells produce interleukin 13// J. Exp. Med., 1995. — Vol. 181(4). — P. 1373–1380.
12. Cidre L.L., Eijan A.M., Bertolesi G. et al. Influence of mast cells on two murine mammary adenocarcinomas // Tumour Biol., 1996. — Vol.17(6). — P. 345–353.
13. Flint N., Cove F.L., Evans G.S. Heparin stimulates the proliferation of intestinal epithelial cells in primary culture // J. Cell. Sci. 1994. 107 (Pt 2). — P. 401–411.
14. Givan A.L. Flow cytometry: first principles. New York, 1992. 202 P.
15. Creaves M.W., Sabroe R.A. Histamine: the quintessential mediator // J. Dermatol., 1996. — Vol. 23(11). — P. 735–740.
16. Yamashita Y., Nakagomi K., Takeda T., Hasegawa S., Mitsui Y. Effect of heparin on pulmonary fibroblasts and vascular cells// Thorax., 1992.— Vol. 47(8). — P. 634–639.