УДК 612.111.3.

ВЛИЯНИЕ КАТЕХОЛАМИНОВ НА ЭРИТРОПОЭЗ В КУЛЬТУРЕ ЭРИТРОБЛАСТИЧЕСКИХ ОСТРОВКОВ

Н.В. Тишевская
e–mail: yunc@chel.surnet.ru

Южно–Уральский научный центр РАМН, г. Челябинск, Россия

Статья поступила 15 октября 2004 г.

Введение

В регуляции эритропоэза важную роль играет симпатический отдел вегетативной нервной системы, эффекты которого на развитие клеток костного мозга реализуются через α– и β–адренорецепторы. Известно, что стимуляция этих рецепторов адреномиметиками приводит к возрастанию секреции эритропоэтина в почках [7] и увеличению количества эритроцитов в периферической крови [1]. Показано, что подкожное введение адреналина интактным животным сопровождается нарастанием числа базофильных эритробластов в парциальной эритрограмме, а также увеличением количества митозов в клетках костного мозга [8]. В опытах с использованием селективных и неселективных адреномиметиков было установлено, что стимуляция β_2–адренорецепторов на фоне эритропоэтина потенцирует рост эритроидных колоний in vitro [10]. Использование культуры эритробластических островков (ЭО) в качестве модели костно–мозгового эритропоэза позволило нам количественно оценить изменения в темпах развития эритроидных клеток и в частоте контактов эритроидной «короны» островков с клетками других гемопоэтических линий при культивировании ЭО в присутствии возрастающих концентраций катехоламинов.

1. Методика исследования

Для получения культуры эритробластических островков костный мозг, выделенный из бедренных костей, суспендировали в среде, содержащей фетальную сыворотку, среду F–12 и гепарин. Суспензию в чашках Петри (из расчета 10^4островков на 1 мл среды) помещали на 30 минут в термостат (t = 37 °C) для адгезии эритробластических островков. Затем средой F–12 смывали неадгезировавшиеся клетки, а чашки Петри заполняли средой культивирования, содержащей фетальную сыворотку, среду RPMI–1640, глутамин, меркаптоэтанол, антибиотики и 0,5 МЕ./мл рекомбинантного эритропоэтина человека (Boehringer Mannheim, Германия). В опытные культуры добавляли растворы адреналина гидрохлорида или норадреналина гидротартрата до конечной концентрации 10^{-6}, 10^{-9} и 10^{-12} М. Контролем служили культуры ЭО, не содержащие катехоламинов. Далее чашки Петри с эритробластическими островками культивировали в течение 24 или 72 часов в газопроточном термостате при t = 37 °C и содержании углекислого газа 4,5 % (по Ю.М. Захарову и М. Прена) [11]. Контроль жизнеспособности культур производили на инвертированном микроскопе Биолам–П–1. В полученных препаратах подсчитывали общее количество ЭО на поверхности чашки Петри, распределение островков по классам зрелости [5], а также определяли процентное содержание островков, в состав эритроидной «короны» которых входили нейтрофильные гранулоциты, лимфоидные клетки и эозинофильные гранулоциты, по отношению к общему числу ЭО данного класса зрелости. Для проверки гипотезы о наличии достоверных различий между опытными и контрольными группами использовались критерий интегральных различий Колмогорова–Смирнова и метод парных сравнений Шефе. Расчеты были выполнены с помощью лицензионного статистического пакета прикладных программ Stadia–6.3 prof.

2. Результаты и обсуждение

В результате проведенных экспериментов было установлено, что адреналин и норадреналин оказывали однонаправленное действие на эритропоэз в культуре ЭО. Наиболее отчетливо это влияние проявлялось при культивировании островков в среде с добавлением адреналина гидрохлорида и норадреналина гидротартрата в конечных концентрациях 10^{-6} и 10^{-9} М (табл. 1, 2). Однако важно подчеркнуть, что были обнаружены динамические различия в реализации эффектов катехоламинов на эритропоэз в культуре ЭО. Так, при добавлении указанных концентраций норадреналина достоверно увеличивалось количество ЭО пролиферирующих классов (1, 2 классов зрелости и реконструирующихся островков) и уменьшалось число инволюцирующих островков, содержащих в своей «короне» только зрелые неделящиеся эритроидные клетки и ретикулоциты, через 24 часа с начала культивирования. В то же время описанные изменения темпов развития эритроидных клеток в ЭО в культурах с добавлением адреналина развивались лишь к 72–му часу исследования. В приведенных таблицах обозначено: * — наличие интегральных различий между контрольными и опытными показателями; ▲ — наличие интегральных различий между показателями в 24–часовых и 72–часовых культурах.

Таблица 1

Динамика количества ЭО различных классов зрелости при добавлении в культуры адреналина гидрохлорида

Концентрация адреналина, М	ЭО (на чашке Петри)					
	Общее количество	1 класса	2 класса	3 класса	Инволюцир.	Реконстр.
	24–х часовое культивирование					
Контроль	1468,4 ± 21,1	64,7 ± 2,7	92,6 ± 3,3	344,7 ± 10,3	763,5 ± 17,1	193,9 ± 4,7
10^{-6}	1450,5 ± 18,3	60,1 ± 2,4	92,3 ± 3,7	328,8 ± 15,9	764,7 ± 9,1	203,3 ± 12,9
10^{-9}	1448,8 ± 15,2	58,7 ± 3,0	91,9 ± 3,3	334,7 ± 8,1	769,0 ± 6,5	193,1 ± 5,3
10^{-12}	1447,7 ± 16,1	61,9 ± 2,5	84,9 ± 6,2	321,4 ± 9,9	792,6 ± 12,2	184,6 ± 8,8
	72–х часовое культивирование					
Контроль	1391,4 ± 12,9	35,8 ± 1,8▲	62,1 ± 3,3▲	268,6 ± 5,1▲	856,6 ± 6,9▲	166,9 ± 5,4
10^{-6}	1413,0 ± 14,1	52,1 ± 2,5*	78,3 ± 1,5*	280,2 ± 7,8 ▲	801,1 ± 9,1*	195,1 ± 2,8*
10^{-9}	1402,7 ± 11,6	48,9 ± 2,8*	68,9 ± 3,9	268,3 ± 4,3 ▲	803,9 ± 5,2*	201,5 ± 4,5*
10^{-12}	1396,8 ± 13,3	42,1 ± 5,7	71,1 ± 2,8	271,3 ± 4,7 ▲	841,6 ± 3,5	171,4 ± 2,3

При анализе исследуемых опытных культур ЭО были получены данные о различиях в клеточном составе «короны» островков, причем изменения числа контактов ЭО с клетками других гемопоэтических линий наблюдались в те же временные промежутки, что и изменения в количестве островков различных классов зрелости. Так, при добавлении в культуральную среду 10^{-6} М норадреналина гидротартрата среди реконструирующихся островков через 24 часа достоверно увеличивалось процентное содержание ЭО с лимфоидными клетками в «короне» (табл. 3). Присутствие в культуральной среде 10^{-6} М адреналина гидрохлорида лишь через 72 часа с начала культивирования приводило к достоверному повышению числа островков всех исследуемых классов зрелости с лимфоидными клетками в «короне» (табл. 4).

Частота контактов эритроидной «короны» островков с нейтрофильными гранулоцитами не претерпевала никаких изменений в культурах ЭО с добавлением адреналина гидрохлорида, в то же время добавление в культуральную среду норадреналина гидротартрата в концентрациях 10^{-6} и 10^{-9} М через 24 часа культивирования приводило к достоверному уменьшению процентного содержания реконструирующихся островков, в составе эритроидной «короны» которых встречались нейтрофильные гранулоциты (табл. 5).

Таблица 2

Динамика количества ЭО различных классов зрелости при добавлении в культуры норадреналина гидротартрата

Концентрация норадреналина, М	ЭО (на чашке Петри)					
	Общее количество	1 класса	2 класса	3 класса	Инволюцир.	Реконстр.
	24–х часовое культивирование					
Контроль	1457,5 ± 15,5	64,5 ± 2,5	84,2 ± 5,4	344,9 ± 3,6	771,4 ± 13,2	192,9 ± 4,8
10^{-6}	1498,2 ± 16,9	84,8 ± 1,6*	95,7 ± 8,2	354,3 ± 9,8	720,2 ± 12,8*	232,4 ± ?,8*
10^{-9}	1459,4 ± 12,2	73,3 ± 2,1	84,2 ± 9,6	363,9 ± 4,3	740,5 ± 11,7	227,9 ± ?,2*
10^{-12}	1437,4 ± 10,3	60,6 ± 1,5	82,2 ± 5,6	359,1 ± 4,3	740,0 ± 12,9	195,6 ± 3,3
	72–х часовое культивирование					
Контроль	1394,6 ± 9,9	37,8 ± 3,1▲	63,4 ± 2,5	245,9 ± 7,7▲	881,5 ± 11,1▲	165,2 ± 6,1
10^{-6}	1414,1 ± 12,5	33,8 ± 2,3▲	86,8 ± 2,7*****	278,3 ±1,7*▲	847,0 ± 13,7▲	176,0 ± 3,9▲
10^{-9}	1405,8 ± 19,1	34,6 ± 3,1▲	68,7 ± 3,3	253,6 ± 6,1▲	870,5 ± 8,8▲	178,5 ± 2,7▲
10^{-12}	1387,7 ± 15,5	37,7 ± 2,4▲	60,5 ± 3,2	251,6 ± 7,4▲	880,8 ± 5,3▲	155,1 ± 2,6▲

Таблица 3

Количество ЭО разных классов зрелости (в %) с лимфоидными клетками в «короне» при 24–х часовом культивировании с норадреналина гидротартратом

ЭО	Контроль	10^{-6} М	10^{-9} М	10^{-12} М
1 класса зрелости	25,1 ± 1,5	31,3 ± 2,3	26,1 ± 2,5	25,9 ± 1,9
2 класса зрелости	9,0 ± 0,4	8,2 ± 1,6	9,4 ± 1,1	9,7 ± 0,6
3 класса зрелости	2,0 ± 0,1	1,7 ± 0,8	1,9 ± 0,6	2,1 ± 0,3
Инволюцирующие	0,5 ± 0,1	0	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,1
Реконструирующиеся	26,4 ± 2,2	39,5 ± 2,7*	30,0 ± 2,3	29,8 ± 1,8

Таблица 4

Количество ЭО разных классов зрелости (в %) с лимфоидными клетками в «короне» при 72–х часовом культивировании с адреналина гидрохлоридом

ЭО	Контроль	10^{-6} М	10^{-9} М	10^{-12} М
1 класса зрелости	11,0 ± 1,1	32,4 ± 2,2*	16,0 ± 1,2	9,4 ± 0,9
2 класса зрелости	5,1 ± 0,8	13,4 ± 1,8*	5,2 ± 0,9	4,8 ± 0,6
3 класса зрелости	0,7 ± 0,3	2,8 ± 0,7*	0,8 ± 0,4	1,0 ± 0,4
Инволюцирующие	0	0	0	0
Реконструирующиеся	17,8 ± 1,5	25,2 ± 0,6*	21,4 ± 0,9	16,6 ± 1,7

Таблица 5

Количество ЭО (в %) с нейтрофильными гранулоцитами в «короне» при 24–х часовом культивировании с норадреналина гидротартратом

ЭО	Контроль	10^{-6} М	10^{-9} М	10^{-12} М
3 класса зрелости	11,3 ± 1,4	6,1 ± 0,4	6,9 ± 1,2	10,5 ± 1,7
Инволюцирующие	28,3 ± 2,6	19,9 ± 1,6	21,4 ± 1,8	21,9 ± 1,5
Реконструирующиеся	14,5 ± 2,2	3,1 ± 1,1*****	3,3 ± 0,7*****	6,8 ± 1,5

Влияние катехоламинов на частоту контактов эритробластических островков с эозинофильными гранулоцитами имело ту же тенденцию, что и воздействие исследуемых биогенных аминов на процесс адгезии зрелых клеток нейтрофильного ряда к «короне» культивируемых ЭО. Присутствие адреналина в культивационной среде не изменяло процентного содержания островков, контактирующих с эозинофильными клетками, а добавление норадреналина в концентрациях 10^{-6} и 10^{-9} М приводило к достоверному снижению числа контактов островков 3–го класса зрелости и реконструирующихся ЭО в 2—3 раза по сравнению с контрольными значениями (табл. 6).

Таблица 6.

Количество ЭО (в %) с эозинофильными гранулоцитами в «короне» при 24–х часовом культивировании с норадреналина гидротартратом

ЭО	Контроль	10^{-6} М	10^{-9} М	10^{-12} М
3 класса зрелости	18,6 ± 2,5	8,2 ± 1,2*	8,3 ± 1,2*	12,5 ± 1,9
Инволюцирующие	29,3 ± 2,2	18,7 ± 2,4	21,5 ± 2,2	22,7 ± 2,3
Реконструирующиеся	12,1 ± 1,3	4,2 ± 1,1*	4,6 ± 1,4*	7,6 ± 1,8

Заключение

В результате исследования эритропоэза в культуре эритробластических островков было установлено, что катехоламины (адреналин и норадреналин) обладают стимулирующим действием на процессы пролиферации эритроидных клеток, увеличивая количество островков 1–го и 2–го классов зрелости, содержащих в «короне» способные к делению проэритробласты, базофильные и ранние полихроматофильные эритробласты. Кроме того, присутствие катехоламинов в культивационной среде способствует усиленной реконструкции эритропоэза, о чем свидетельствует снижение числа инволюцирующих островков в культуре с одновременным возрастанием количества реконструирующихся ЭО. По–видимому, стимуляция адренорецепторов центральных макрофагов ЭО ускоряет процессы освобождения их от зрелой эритроидной «короны» и повышает аффинитет макрофагов, уже участвующих в эритропоэзе, к клеткам–предшественницам — КОЕэ и препроэритробластам. Таким образом, катехоламины активируют и процессы образования ЭО на базе контактов костно–мозговых макрофагов с КОЕэ (эритропоэз de novo), и механизмы повторного вовлечения центральных макрофагов островков в кроветворение (эритропоэз de repete). Различия во времени развития указанных эффектов между адреналином и норадреналином могут объясняться их неоднозначным воздействием на α– и β–адренорецепторы. Так, в работах с культурой клеток куриного эмбриона было показано, что увеличение количества адреналина в среде культивирования в первые часы исследования угнетает процессы транскрипции и снижает количество цитоплазматической РНК, в то время как активация норадренэргических систем сопровождается стимуляцией транскрипции и увеличением синтеза РНК [3]. Присутствие в эритроидной «короне» островков клеток других гемопоэтических линий отмечалось нами и ранее [4]. Лимфоидные клетки, контактирующие с «короной» островков пролиферирующих классов, возможно, являются КОЕэ (эти унипатентные клетки–предшественницы морфологически не отличаются от малых лимфоцитов) или Т–лимфоцитами, активирующими гемопоэз [2, 9]. Отсутствие нейтрофильных и эозинофильных гранулоцитов в «короне» пролиферирующих островков (1–го и 2–го классов) и максимальное их количество в инволюцирующих ЭО мы объясняем различной биологической ролью самих клеток «белого» ряда. Частота взаимодействия нейтрофильных и эозинофильных лейкоцитов с «короной» зрелых эритробластических островков может быть связана с появлением микроповреждений в мембране макрофагов, вероятнее всего, вызванной отсоединением ретикулоцитов от мембраны макрофагов, что является ферментозависимым процессом [6].

Проведенные нами исследования эритропоэза в культуре эритробластических островков подтверждают немаловажную роль медиаторов симпатического отдела вегетативной нервной системы в регуляции костно–мозгового кроветворения. Поскольку образование ЭО осуществляется на основе лиганд–рецепторного взаимодействия макрофагов костного мозга с эритроидными клетками–предшественницами при участии компонентов гемопоэтического микроокружения, модулируя один или несколько из этих процессов, катехоламины способны оказывать стимулирующее действие на развитие эритроидной ткани.

Список литературы

1. Аполлонова Л.А. Эритроцитарные и метаболические сдвиги при длительной экспериментальной гиперкатехоламинемии // Бюл. эксперим. биол. и мед., 1987. № 2. С. 148—151.
2. Бабаева А.Г. Иммунологические механизмы регуляции восстановительных процессов. М.: Медицина, 1972. 157 с.
3. Божко Г.Х. Влияние катехоламинов на синтез белков и нуклеиновых кислот // Проблемы эндокринологии, 1984. № 2. С. 3—8.
4. Захаров Ю.М., Тишевская Н.В. Об особенностях ассоциации клеток моноцитарной, эритроидной и гранулоцитарной линий в кроветворной ткани // Мед. акад. журн., 2003. Т. 3, № 2. С. 11—18.
5. Захаров Ю.М., Мельников И.Ю., Рассохин А.Г. Классификация эритробластических островков с учетом изменения их клеточного состава // Арх. анатомии, гистологии и эмбриологии, 1990. Т. 98, № 5. С. 38—42.
6. Захаров Ю.М., Рассохин А.Г. Эритробластический островок. М.: Медицина, 2002. 280 с.
7. Павлов А.Д., Морщакова Е.Ф. Регуляция эритропоэза. М.: Медицина, 1987. 271 с.
8. Хилько А.С., Каменев Б.А. Морфологические изменения в кроветворных органах крыс под влиянием адреналина // Физиологический журнал им. И.М. Сеченова, 1982. № 1. С. 40—45.
9. Шахов В.П., Гумилевский Б.Ю. и др. Феномен трехклеточной кооперации макрофаг–Т–лимфоцит–кроветворная клетка в гемопоэтическом островке костного мозга при стрессе // Клеточная иммунология, 1999. № 3. С. 25—26.
10. Adamson J., Torok–Storb B., Lin N. Analisis of erythropoiesis by erythroid colony formation in culture // Blood cells, 1978. Vol. 4. P. 89—103.
11. Zakharov Y. M., Prenant M. Technique d'isolement et de culture des Oots erytroblastiques. Separation du macrophage central // Nouv. Rev. Franc. Hematol, 1982. Vol. 24, № 6. P. 154—162.