

АДГЕЗИВНЫЕ СВОЙСТВА ЭРИТРОБЛАСТИЧЕСКИХ ОСТРОВКОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СОСТОЯНИЯХ ЭРИТРОПОЭЗА.

Щипицын М.А.

ГОУ ВПО «Челябинская государственная медицинская академия» Росздрава, г. Челябинск

masch_2003@mail.ru

Изучение адгезивных взаимодействий клеток друг с другом и с компонентами экстрацеллюлярного матрикса являются в настоящее время одной из актуальных проблем как молекулярной биологии [Пальцев М.А., Иванов А.А., 1995], так и медико-биологических дисциплин, использующих теоретическую базу фундаментальных наук для объяснения процессов патогенеза и возможностей лечения заболеваний человека. Исследование взаимодействий макрофага с эритроидными и другими гемопоэтическими клетками представляется интересным в связи с тем, что данная проблема еще пока находится на стадии изучения [Hamamura K. et al., 1996; Kristin L. Goltry., 1997]. Кроме того, адгезивные контакты эритроидных клеток с макрофагом, в составе эритробластических островков (ЭО), являются моделью изучения адгезивных взаимодействий клеток друг с другом.

Цель настоящей работы заключалась в выявлении особенностей адгезивных свойств ЭО различных классов зрелости, а также сравнение адгезии ЭО к субстрату у самцов и самок крыс.

Материалы и методы. В работе были использованы интактные крысы (10 самцов); крысы, подвергнутые острой кровопотере (30 самцов) и посттрансфузионной полицитемии (7 самцов)

Посттрансфузионная полицитемия.

Для изучения влияния ингибирования эритропоэза у животных на адгезивную функцию ЭО однократно внутривенно вводили 80% взвесь гомологичных эритроцитов крысам-реципиентам в количестве 7,0 мл на 100 г массы тела. Периферическую кровь и костный мозг крыс-реципиентов исследовали на 5 сутки посттрансфузионной полицитемии.

Кровопотеря.

В качестве классической модели стимуляции эритропоэза была использована кровопотеря (Дымшиц Р.А., 1958). Кровь у животных забирали из хвостовых вен в количестве 2% от массы тела крыс. Исследования периферической крови и костного мозга проводили на 1, 3, 7, 10 и 14 сутки после кровопотери.

Получение препаратов костного мозга. Препараты эритробластических островков (ЭО) и клеток костного мозга из бедренных костей крыс получали по методу Ю.М. Захарова и соавторов (1984). Клеточную взвесь разводили средой выделения (среда Игла для культур клеток – 66 %; 10%-ый раствор человеческого альбумина – 33%; гепарин – 5 тыс. ед./100 мл среды) и помещали на квадратные предметные стекла, при этом зона с разведённой клеточной взвесью была ограничена на препарате резиновым кольцом. Далее стекла помещали в термостат при T=37°C и при 100% влажности на 45 минут. За это время ЭО и клетки костного мозга оседали и адгезировались.

Метод гидродинамического воздействия на препараты костного мозга. Для сравнения силы адгезивного взаимодействия ЭО различных классов зрелости с субстратом нами была предложена оригинальная методика гидродинамического

воздействия на препараты костного мозга [Рассохин А.Г., Щипицын М.А., 2002; Щипицын М.А., 2005]. После инкубации в термостате стекла вынимали и производили смывы с областей адгезии поршневым автоматическим медицинским дозатором А-2 по 1 мл (Министерство медицинской промышленности СССР, ВПО «Союзмедприбор», Одесское производственное объединение «Медлабортехника», 1985). На область адгезии первой группы стекол производили один смыв (1 мл среды Игла), второй группы стекол –десять смывов, с третьей- пятьдесят смывов (по 1 мл среды Игла). Средняя кинетическая энергия струи жидкости (среда Игла), подаваемой из сопла дозатора, оставалась постоянной. Для расчёта гидродинамического давления мы использовали уравнение Бернулли:

$$\Delta = p + \gamma \cdot h + (\rho \cdot V^2)/2 = \text{const}, \text{ где} \quad (1)$$

p -«статическое давление» (пьезоэлектрический напор), давление, сжимающее частицу жидкости;

$\gamma \cdot h$ -изменение давления при изменении высоты на величину h ;

$(\rho \cdot V^2)/2$ -«динамическое давление» (скоростной напор).

Жидкость в цилиндре дозатора А-2 находится под давлением, создаваемом поршнем. Данное давление намного больше, чем давление, создаваемое весом жидкости, следовательно, изменениями давления по высоте столба (h) жидкости можно пренебречь и считать истечение жидкости, находящейся в замкнутом сосуде под давлением p . Поэтому мы определили линейную среднюю скорость истечения жидкости из сопла дозатора (0,764 м/с). В этих случаях можно считать константу в уравнении Бернулли (1) постоянной по всему объёму текущей из сопла жидкости и равной p , давлению в цилиндре дозатора, так как скоростью течения жидкости в цилиндре можно пренебречь вследствие того, что площадь сечения цилиндра много больше сечения отверстия сопла дозатора.

Преобразовав уравнение Бернулли, мы рассчитывали только гидродинамическую составляющую давления, создаваемого поршнем дозатора:

$$P_{\text{гидродин}} = (\rho \cdot V^2)/2, \text{ где} \quad (2)$$

$\rho \approx 1000 \text{ кг/м}^3$ (плотность среды Игла),

$V = 0,764 \text{ м/с}$ (линейная скорость жидкости на выходе из сопла).

Таким образом, подставив вышеуказанные значения в уравнение (2), гидродинамическое давление жидкости оказалось равным 292 Па.

Приготовление препаратов.

После смывов края стекла промакивали салфеткой, помещали в полистироловые чашки Петри (35мм) и центрифугировали при 1000 об/мин 40-45 секунд (для лучшего распластывания клеток). Стекла высушивали на воздухе и фиксировали метиловым спиртом. Затем препараты окрашивали гематологическим красителем по Романовскому-Гимза. Общее количество ЭО подсчитывали на всем препарате под малым увеличением (x600), количество ЭО выражали на 1 см² препарата. Для оценки количества ЭО различных классов (формула ЭО) зрелости препарат анализировали под большим увеличением (x1350) с масляной иммерсией.

Методы статистического анализа. Для анализа данных использовали пакеты прикладных программ Statistica (StatSoft, USA), редактора электронных таблиц MS Excel 2000. Для проверки гипотезы о виде распределения пользовались критерием нормальности Колмогорова-Смирнова. Достоверность различий между двумя независимыми группами исследуемых показателей с помощью непараметрического аналога критерия Стьюдента – критерий Колмогорова–

Смирнова. Непрерывные переменные представлены в виде $M \pm SE$ (среднее арифметическое \pm стандартная ошибка).

Результаты. Общее количество ЭО на 1 см^2 препарата достоверно снижалось с увеличением кратности смывов со стекла. О силе адгезивного взаимодействия ЭО с субстратом (стеклом) мы судили по отношению количества ЭО, оставшихся на препарате после однократного смыва, к количеству ЭО на препаратах, подвергшихся 50-тикратному смыву. Общее количество ЭО интактных самцов на препаратах уменьшилось в 1,274 раза с 1283 ± 48 (1-кратный смыв) до 1007 ± 43 (50-тикратный смыв) на 1 см^2 ($p < 0,05$), а количество ЭО на препаратах, полученных из костного мозга крыс после острой кровопотери (на 1-ые сутки) уменьшилось с 2278 ± 103 (1-кратный смыв) до 857 ± 80 (50-тикратный смыв), то есть в 2,66 раза ($p < 0,05$). В то время, как на препаратах, полученных из костного мозга полицитемичных животных, убывание среднего количества ЭО на 1 см^2 препаратов с увеличением кратности смывов составляло 1,52 раз ($p < 0,05$). Следовательно, можно сделать заключение о том, что при изменённых состояниях эритропоэза адгезия ЭО к стеклу уменьшается в большей степени после острой кровопотери (стимуляция эритропоэза) и в меньшей степени на 5-ые сутки посттрансфузионной полицитемии (угнетение эритропоэза). Следует отметить, что как при постгеморрагической анемии, так и после посттрансфузионной полицитемии, адгезия ЭО к стеклу остаётся ниже, чем у ЭО интактных животных. Анализ количества ЭО различных классов зрелости на 1 см^2 препарата также выявил снижение их количества с увеличением кратности смывов, кроме того, мы наблюдали отличия в паттерне убывания количества ЭО разных классов зрелости. Вероятно, это связано с особенностями динамики перестройки, синтеза и развёртывания рецепторов адгезии центрального макрофага ЭО и окружающих его эритробластов в период интенсивной пролиферации и созревания. Таким образом, предложенная нами оригинальная методика гидродинамического воздействия на препараты ЭО костного мозга позволила выявить один из аспектов функциональной гетерогенности ЭО различных классов зрелости в ответе на различные эритропоэз-стимулирующие и угнетающие факторы.