

АКТИВАЦИЯ ТУЧНЫХ КЛЕТОК ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА У 3-НЕДЕЛЬНЫХ КРЫСЯТ

© И. Л. Ерохина,¹ М. Г. Мартынова,¹ О. М. Мусеева,² О. И. Емельянова¹

¹ Институт цитологии РАН и ² Научно-исследовательский институт кардиологии им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург;

¹ электронный адрес: heartdev@mail.cytspb.rssi.ru

Известно, что тучные клетки (ТК) принимают активное участие в регенераторных процессах, протекающих в постинфарктном сердце у взрослых крыс и человека. Мы исследовали поведение популяции ТК в сердце через 20, 60, 75 и 90 сут после экспериментального инфаркта миокарда, вызванного у 3-недельных и взрослых крыс перевязкой левой коронарной артерии. Плотность ТК разной степени зрелости анализировали на парафиновых срезах предсердия и желудочка, окрашенных альциановым голубым — сафранином, и сравнивали с данными, полученными на интактных крысах. Плотность ТК у неоперированных 1.5—2.5-месячных крыс как в предсердии, так и в желудочке составила около 0.6 кл./мм², а у неоперированных 3.5—4.0-месячных крыс в предсердии — 1.2, в желудочке — 0.6 кл./мм². После операции у 3-недельных крыс плотность ТК в сердце была значительно выше, чем у интактных крыс: в предсердии через 20 и 60 сут — в 5 раз, в желудочке через 60 и 75 сут — в 2 раза. Через 60 сут после индукции инфаркта у взрослых крыс плотность ТК была в предсердии в 3 раза ниже и в желудочке в 2 раза ниже, чем в тех же камерах сердца у оперированных 3-недельных крыс. После инфаркта у 3-недельных крыс через 20 сут резко увеличивается относительная доля малодифференцированных альциан-положительных клеток, а через 60 и 75 сут — доля более дифференцированных сафранин-положительных клеток, что свидетельствует о миграции в миокард незрелых ТК и последующем их созревании. Различия в степени активации ТК при индукции инфаркта у молодых и взрослых крыс могут отражать как более активный иммунный ответ молодых животных, так и биохимические и функциональные особенности ТК у животных разного возраста.

Ключевые слова: тучные клетки, сердце, инфаркт миокарда, крысы, постнатальное развитие.

Тучные клетки (ТК) — это мультифункциональные гранулярные клетки, обнаруженные почти во всех органах (Гавришева, Ткаченко, 2003; Puxeddu et al., 2003). Многочисленные гранулы, заполняющие цитоплазму ТК, содержат широкий спектр биологически активных веществ, таких как цитокины, моноамины, протеазы, протеогликаны, ростовые факторы и др. ТК находятся в тесном контакте с периферическими нервами, с кровеносными и лимфатическими сосудами и играют активную роль при аллергических и иммунологических реакциях, при воспалении, фиброзе и других патофизиологических состояниях. Предшественники ТК поступают из костного мозга в кровь и мигрируют в ткани, где дифференцируются. Пролиферация, дифференцировка и активация ТК регулируются стволовым клеточным фактором, а также рядом интерлейкинов, хемокинами и другими медиаторами. ТК в разных тканях имеют свои цитохимические особенности. Различают мукозные и соединительнотканые ТК.

ТК сердца относятся к популяции соединительнотканых ТК. В норме ТК в сердце взрослых млекопитающих немного, но их количество резко возрастает при миокардите и различных типах кардиомиопатий у людей (Patella et al., 1998; Petrovic et al., 1999) и при экспериментальной патологии миокарда у животных (Olivetti et al., 1989; Engels et al., 1995; Frangogiannis et al., 1998).

В несколько раз увеличивается плотность и секреторная активность ТК в интима аорты и пульмонарной артерии при остром инфаркте миокарда у человека (Жданов и др., 2003). Нет единого мнения о роли этих клеток при патологии миокарда. Известно, что инфаркт миокарда сопровождается воспалительным процессом, при котором некротический очаг заполняется гранулярной тканью, одним из компонентов которой являются ТК. Высказывается предположение о том, что воспалительная реакция развивается как защитный механизм, а ТК играют важную роль в замещении погибших кардиомиоцитов соединительнотканым рубцом (Entman et al., 2000; Somasundaram et al., 2005). Однако имеются данные и о негативном влиянии ТК на миокард при сердечно-сосудистой патологии (Shiota et al., 2003).

Реакция ТК на повреждение миокарда в раннем постнатальном онтогенезе изучена недостаточно. Вместе с тем имеются данные о том, что с возрастом происходит изменение количества ТК и их морфологических, биохимических и функциональных характеристик в сердце (Шашель, 1974; Rakusan et al., 1990) и других органах (Gaytan et al., 1990; Marshall et al., 1994; Jamur et al., 1997). Вопрос об активации ТК в миокарде может представлять интерес для клиницистов, поскольку дети часто страдают от врожденных и приобретенных заболеваний

сердечно-сосудистой системы, а также от различных аллергических реакций, связанных с функцией ТК.

В настоящей работе определяли плотность и степень зрелости ТК при экспериментальном инфаркте миокарда, вызванном у 3-недельных крыс, когда процесс кардиогенеза еще не закончен.

Материал и методика

Инфаркт миокарда левого желудочка у 3-недельных и половозрелых взрослых крыс Вистар массой 166—196 г вызывали перевязкой левой коронарной артерии. Контролем служили 1.5—2.5- и 3.5—4.0-месячные неоперированные крысы. Всего тестировали 44 животных. Через 20, 60, 75 и 90 сут после операции сердца фиксировали в жидкости Карнуа, заливали в парафин и готовили срезы толщиной 5 мкм. Срезы окрашивали в течение 30 мин при комнатной температуре смесью железных квасцов, ализанового голубого 8G и сафранина O, приготовленной на Уолполовском буфере, pH 1.42 (Röhlich, Csaba, 1972), промывали в дистиллированной воде и подкрашивали гематоксилином Майера-эозином. В предсердии, желудочке и соединительной ткани, локализованной между предсердием и желудочком и вокруг входящих в сердце и выходящих из него сосудов, определяли плотность ТК на 1 мм² среза и относительную долю клеток разной степени зрелости (в %). Отдельно определяли количество ТК с ализан-положительными и сафранин-положительными гранулами, а также количество ТК, содержащих одновременно ализан- и сафранин-положительные гранулы. Значимость различий сравниваемых величин оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента.

В работе использованы ализановый голубой 8G (Fluka, Швейцария) и сафранин O (Fisher Science Ed., США).

Результаты

В предсердии и желудочке ТК расположены периваскулярно в толще миокарда между миоцитами, под эпикардом и эндокардом. У неоперированных 1.5—2.5-месячных крыс в миокарде предсердия и желудочка плотность ТК на 1 мм² площади среза невысокая и незначительно возрастает к 3.5—4.0 мес (рис. 1). После инфаркта миокарда у 3-недельных крыс плотность ТК в предсердии по сравнению с таковой у интактных крыс того же возраста через 20 ($P < 0.05$) и 60 ($P < 0.01$) сут увеличивается в 5 раз (рис. 1). Через 75 и 90 сут после инфаркта средняя плотность ТК в предсердии также выше, чем в контроле, однако из-за значительной индивидуальной вариабельности как в опыте, так и в контроле эти различия недостоверны. На всех сроках после индукции инфаркта плотность клеток в желудочке ниже, чем в предсердии. Однако достоверные различия между этими отделами выявляются только через 20 и 60 сут ($P < 0.01$ и $P < 0.05$ соответственно) после инфаркта. По сравнению с контролем плотность клеток в миокарде желудочка достоверно выше через 60 и 75 сут ($P < 0.01$). В отличие от молодых животных после индукции инфаркта у взрослых крыс плотность клеток в предсердии и желудочке не отличается от контроля и через 60 сут в предсердии ниже, чем в этой же зоне у 3-недельных крыс ($P < 0.05$; рис. 1).

В адвентиции крупных сосудов, входящих и выходящих из сердца, и в окружающей их соединительной и

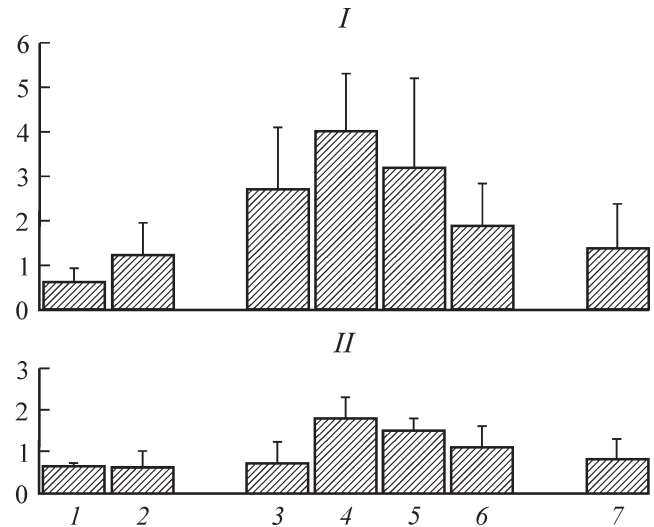


Рис. 1. Плотность тучных клеток в предсердии (I) и желудочке (II) сердца крыс.

По вертикали — плотность клеток (клет./мм²); по горизонтали — 1, 2 — 1.5—2.5- и 3.5—4.0-месячные интактные крысы; 3—6 — через 20, 60, 75 и 90 сут после инфаркта у 3-недельных крыс; 7 — через 60 сут после инфаркта у взрослых крыс. Каждая точка представляет среднее значение \pm SEM.

Fig. 1. Mast cell density in atrium (I) and ventricle (II) of rat heart.

Vertical — number of mast cells per mm² of section; horizontal — 1, 2 — 1.5—2.5- and 3.5—4.0 month-old intact rats; 3—6 — 20, 60, 75 and 90 days after infarction in 3 week-old rats; 7 — 60 days after infarction in adult rats. Each point represents the mean \pm SEM.

жировой тканях как у интактных, так и у оперированных животных плотность ТК в несколько раз выше, чем в миокарде предсердия и желудочка. У контрольных 1.5—2.5- и 3.5—4.0-месячных крыс плотность ТК в этих зонах варьирует в широких пределах: от 8 до 53 (в среднем 26 ± 18) и от 22 до 75 (в среднем 43 ± 21) кл./мм² соответственно. При инфаркте, как и в норме, плотность ТК в этих зонах колеблется в широких пределах: в опытах на 3-недельных крысах через 20 сут после операции — от 4 до 66 (в среднем 18 ± 24) кл./мм², через 60 сут — от 26 до 106 (в среднем 58 ± 43), через 75 сут — от 11 до 25 (в среднем 18 ± 5), в опыте на взрослых крысах через 60 сут после инфаркта — от 42 до 122 (в среднем 83 ± 33) кл./мм², достигая наивысших значений в прослойках соединительной ткани между предсердием и желудочком. Значительная индивидуальная вариабельность значений плотности клеток не позволяет судить о том, имеет ли место активация ТК в этих зонах при инфаркте.

Популяция ТК сердца как в контроле, так и в опыте по гистохимическим характеристикам гетерогенна. Менее дифференцированные ТК содержат гранулы, окрашивающиеся ализановым голубым, а более зрелые имеют гранулы, окрашивающиеся сафранином (Combs et al., 1965; Röhlich, Csaba, 1972; Gaytan et al., 1990; Marshall et al., 1994). Учитывая относительно низкую плотность ТК, этот показатель для предсердия и желудочка суммировали. Соотношение ализан- и сафранин-положительных ТК меняется в процессе развития инфаркта (рис. 2). У контрольных 1.5—2.5-месячных крыс преобладают более зрелые сафранин-положительные клетки. Через 20 сут после индукции инфаркта у 3-недельных крыс в 10 раз увеличивается относительная доля менее дифференцированных ализан-положительных клеток ($P < 0.01$), к 60-м и

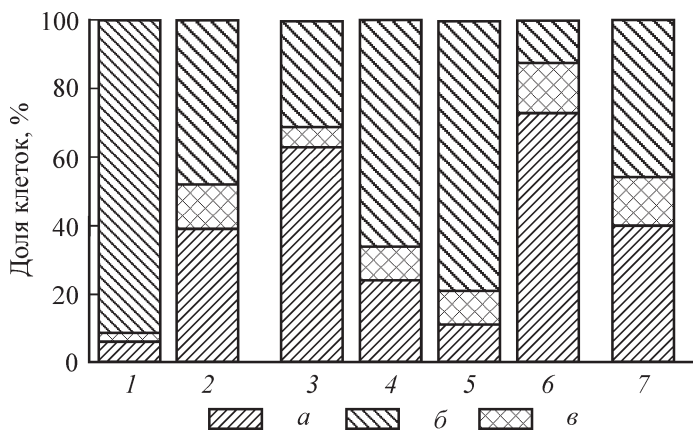


Рис. 2. Распределение тучных клеток разной степени зрелости в сердце крысы.

a — доля клеток с альциан-положительными гранулами (малодифференцированные клетки); *b* — доля клеток с сафранин-положительными гранулами (зрелые клетки); *v* — доля клеток, содержащих альциан- и сафранин-положительные гранулы (клетки промежуточной степени зрелости). Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

Fig. 2. The distribution of mast cells of different level of maturity in rat heart.

a — share of the cells with alcian-positive granules (young cells); *b* — share of the cells with safranin-positive granules (mature cells); *v* — share of the cells, containing alcian- and safranin-positive granules (the cells of intermediate level of maturity). Other designations are as in Fig. 1.

75-м сут после операции она снижается за счет увеличения доли более дифференцированных сафранин-положительных клеток ($P < 0.05$) и вновь увеличивается к 90-м сут ($P < 0.001$). В сердце неоперированных молодых и взрослых крыс через 60 сут после индукции инфаркта соотношение клеток разной степени зрелости имеет близкие значения. Относительная доля ТК, содержащих альциан- и сафранин-положительные гранулы, во всех случаях немногочисленна и колеблется от 3 до 14 %.

Обсуждение

Данные настоящей работы показали, что при инфаркте миокарда, индуцированном у крыс на ранних стадиях постнатального онтогенеза, происходит интенсивная активация ТК. Наблюдаемая динамика соотношения клеток разной степени зрелости свидетельствует о том, что происходит миграция в миокард циркулирующих в крови предшественников ТК и последующее их созревание.

Через 60 сут после индукции инфаркта у взрослых крыс плотность ТК в миокарде не отличается от контрольных значений, в то время как у молодых крыс через 60 сут плотность ТК в несколько раз превышает уровень этого показателя у молодых интактных животных. Нельзя исключить, что у взрослых крыс развивающаяся при инфаркте гипертрофия кардиомиоцитов и всего миокарда (Rumyantsev, 1991) может снижать количество ТК на единицу площади среза. Различия по интенсивности реакции перитонеальных ТК у молодых и зрелых крыс показаны и при экспериментальном повреждении печени (Grizzi et al., 2002). Имеются данные о том, что перитонеальные ТК молодых и взрослых крыс различаются биохимически и функционально (Marshall et al., 1994). Наблюдаемые различия в степени активации ТК у животных разного возраста могут отражать как функциона-

льные особенности клеток, так и активный иммунный ответ молодых животных.

Наблюдение более высокой, чем в желудочке, плотности ТК в предсердии при инфаркте миокарда представляет интерес в связи с особенностями миоцитов предсердия. Известно, что миоциты предсердия кроме сократительной выполняют эндокринную функцию — синтезируют натрийуретический гормон, принимающий активное участие в регуляции сердечно-сосудистого гомеостаза. Наличие предсердного натрийуретического пептида было показано также в ТК сердца (Belloni et al., 2005) и перитонеальной полости (Martynova et al., 2005) крыс. Кроме того, предсердные миоциты легче, чем желудочковые, вступают в реактивную пролиферацию при инфаркте миокарда (Румянцев и др., 1987; Rumyantsev, 1991). В связи с этим можно предположить, что выделяемые ТК факторы роста (Ren et al., 2003) стимулируют пролиферативную активность миоцитов предсердия. Это предположение согласуется с данными о концентрации ТК в зонах экспрессии PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) при инфаркте миокарда (Frangogiannis et al., 1998).

Следует отметить, что в исследованный нами период развития ТК накапливаются и в нормальном постнатальном онтогенезе. Так, низкая плотность ТК в сердце 11—12-суточных крыс значительно увеличивается в следующие 2—3 нед и достигает максимальных значений у крыс в возрасте 1 мес (Rakusan et al., 1990). Выявленное нами при инфаркте возрастание плотности ТК накладывается на естественное увеличение количества ТК в сердце. В этот период протекает и активный процесс ангиогенеза, в котором принимают участие ТК, выделяя ангиогенные медиаторы, регулирующие пролиферацию и функцию эндотелиоцитов (Hiromatsu, Toda, 2003).

Продуцируемые ТК цитокины и факторы роста, такие как фибробластный фактор роста, васкулярный эндотелиальный фактор роста, трансформирующий фактор роста и др., способствуют не только ревазуляризации поврежденной ткани, но и привлечению в зону формирования рубца фибробластов (Entman et al., 2000; Ren et al., 2003; Somasundaram et al., 2005).

С другой стороны, имеются данные о том, что при сердечно-сосудистой патологии ТК участвуют в индукции гипертрофии сердца и фиброза, которые приводят в конечном счете к сердечной недостаточности (Shiota et al., 2003). Гистамин, выделяемый при дегрануляции ТК, вызывает спазм коронарных артерий и таким образом способствует развитию инфаркта миокарда (Laine et al., 1999). В экспериментах *in vitro* показано, что культивирование кардиомиоцитов с гранулами ТК вызывает апоптоз мышечных и пролиферацию неммышечных клеток (Hara et al., 1999).

Таким образом, поведение ТК у молодых животных после инфаркта миокарда характеризуется рядом особенностей, что следует учитывать при анализе процессов, протекающих в постинфарктном сердце.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-49393).

Список литературы

Гавришева Н. А., Ткаченко С. Б. 2003. Тучные клетки сердца в норме и при патологии. Кардиология. 43 (6) : 59—65.

- Жданов В. С., Дробкова И. П., Чумаченко П. В., Черпаченко Н. М. 2003. Гиперплазия и дегрануляция тучных клеток в интима аорты и пульмонарной артерии при остром инфаркте миокарда. Кардиология. 43 (11) : 32—35.
- Румянцев П. П., Коро Анттич Р. М., Нилова В. К. 1987. Пролиферативные процессы в миокарде разных отделов сердца при создании экспериментального инфаркта миокарда левого желудочка у двух- трехнедельных крысят. Цитология. 29 (1) : 35—46.
- Шашель Н. С. 1974. Возрастная динамика тучных клеток в сердце человека. Цитология и генетика. 8 (3) : 220—221.
- Belloni A. S., Guidolin D., Salmasso R., Bova S., Rossi G. P., Nussdorfer G. G. 2005. Adrenomedullin, ANP and BNP are colocalized in a subset of endocrine cells in the rat heart. *Int. J. Mol. Med.* 15 : 567—571.
- Combs J. W., Lagunoff D., Benditt E. P. 1965. Differentiation and proliferation of embryonic mast cells of the rat. *J. Cell Biol.* 25 : 577—592.
- Engels W., Reiters P. H., Daemen M. J., Smits J. F., van der Vusse G. J. 1995. Transmural changes in mast cell density in rat heart after infarct induction *in vitro*. *J. Pathol.* 177 : 423—429.
- Entman M. L., Youker K. A., Frangogiannis N., Lakshminarayanan V., Nossuli T., Evans A., Kurrelmeyer K., Mann D. L., Smith C. W. 2000. Is inflammation good for the ischemic heart — perspectives beyond the ordinary. *Z. Kardiol.* 89 : IX/82—IX/87.
- Frangogiannis N. G., Perrard J. L., Mendoza L. H., Burns A. R., Lindsey M. L., Ballantyne C. M., Michael L. H., Smith C. W., Entman M. L. 1998. Stem cell factor induction is associated with mast cell accumulation after canine myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation.* 98 : 687—698.
- Gaytan F., Bellido C., Carrera G., Aguilar E. 1990. Differentiation of mast cells during postnatal development of neonatally estrogen-treated rats. *Cell Tissue Res.* 259 : 25—31.
- Grizzi F., Franceschini B., Barbieri B., Gagliano N., Arosio B., Chiriva-Internati M., Annoni G., Dioguardi N. 2002. Mast cell density: a quantitative index of acute liver inflammation. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 24 : 63—69.
- Hara M., Matsumori A., Ono K., Kido H., Hwang M. W., Miyamoto T., Iwasaki A., Okada M., Nakatani K., Sasayama S. 1999. Mast cells cause apoptosis of cardiomyocytes and proliferation of other intramyocardial cells *in vitro*. *Circulation.* 100 : 1443—1449.
- Hiromatsu Y., Toda S. 2003. Mast cells and angiogenesis. *Microrosc. Res. Tech.* 60 : 64—69.
- Jamur M. C., Lunardi L. O., Vugman I. 1997. Mast cell maturation in young rats: a histofluorescence and cytochemical study. *Acta histochem.* 99 : 379—389.
- Laine P., Kaartinen M., Penttila A., Panula P., Paavonen T., Kovanen P. T. 1999. Association between myocardial infarction and the mast cells in the adventitia of the infarct-related coronary artery. *Circulation.* 99 : 361—369.
- Marshall J. S., Kawabori S., Nielsen L., Bienenstock J. 1994. Morphological and functional characteristics of peritoneal mast cells from young rats. *Cell Tissue Res.* 276 : 565—570.
- Martynova M. G., Bystrova O. A., Moiseeva O. M., Evdonin A. L., Kondratov K. A., Medvedeva N. D. 2005. The presence of ANP in rat peritoneal mast cells. *Cell Res.* 15 : 811—816.
- Olivetti G., Lagrasta C., Ricci R., Sonnenblick E. H., Capasso J. M., Anversa P. 1989. Long-term pressure-induced cardiac hypertrophy: capillary and mast cell proliferation. *Amer. J. Physiol.* 257 : H1766—H1772.
- Patella V., Marino I., Arbustini E., Lamparter-Schummert B., Verga L., Adt M., Marone G. 1998. Stem cell factor in mast cells and increased mast cell density in idiopathic and ischemic cardiomyopathy. *Circulation.* 97 : 971—978.
- Petrovic D., Zorc M., Zorc-Pleskovic R., Vraspir-Porenta O. 1999. Morphometrical and stereological analysis of myocardial mast cells in myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Folia Biol. (Praha).* 45 : 63—66.
- Puxeddu I., Piliponsky A. M., Bachelet I., Levi-Schaffer F. 2003. Mast cells in allergy and beyond. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35 : 1601—1607.
- Rakusan K., Sarkar K., Turek Z., Wicker P. 1990. Mast cells in the rat heart during normal growth and in cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* 66 : 511—516.
- Ren G., Dewald O., Frangogiannis N. G. 2003. Inflammatory mechanisms in myocardial infarction. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy.* 2 : 242—256.
- Röhlich P., Csaba G. 1972. Alcian blue — safranin staining and ultrastructure of rat mast cell granules during degranulation. *Acta boil. Acad. sci. hung.* 23 : 83—89.
- Rumyantsev P. P. 1991. Growth and hyperplasia of cardiac muscle cells. Chur (Switzerland): Harwood Acad. Publ. 376 p.
- Shiota N., Rysa J., Kovanen P. T., Ruskoaho H., Kokkonen J. O., Lindstedt K. A. 2003. A role for cardiac mast cells in the pathogenesis of hypertensive heart disease. *J. Hypertens.* 21 : 1935—1944.
- Somasundaram P., Ren G., Nagar H., Kraemer D., Mendoza L., Michael L. H., Caughey G. H., Entman M. L., Frangogiannis N. G. 2005. Mast cell tryptase may modulate endothelial cell phenotype in healing myocardial infarcts. *J. Pathol.* 205 : 102—111.

Поступила 20 III 2006

ACTIVATION OF MAST CELLS AFTER EXPERIMENTAL MYOCARDIAL INFARCTION IN 3 WEEK-OLD RATS

I. L. Erokhina,¹ M. G. Martynova,¹ O. M. Moiseeva,² O. I. Emelyanova¹

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, and ² V. A. Almazov Institute of Cardiology, St. Petersburg;

¹ e-mail: heartdev@mail.cytspb.rssi.ru

It is known that mast cells (MC) take an active part in regeneration processes in postinfarction heart in adult rats and humans. Behaviour of population of cardiac MCs has been studied 20, 60, 75 and 90 days after experimental myocardial infarction induced in 3 week-old and adult rats by ligation of left coronary artery. The density of MC of different degrees of maturity was estimated in atrium and ventricle on paraffin sections stained with Alcian blue — Safranin. Findings were compared with MC density obtained in hearts of intact rats. The MC density in intact 1.5—2.5 month-old rats in atrium and ventricle was about 0.6 cells/mm², in intact 3.5—4.0 month-old rats in atrium — 1.2 cells/mm², in ventricle — 0.6 cells/mm². The MC density in 3 week-old rats with infarction was significantly higher than in intact rats: 5-fold increase in 20 and 60 days in atrium, and 2-fold increase in 60 and 75 days in ventricle. In 60 days after infarction the MC density in adult rats was 3 times lower in atrium and 2 times lower in ventricle than in the same heart compartments of 3 week-old rats with infarction. After infarction in 3 week-old rats, a relative share of young cells with alcian-positive granules sharply increased in 20 days and then decreased by 60—75 days. This indicates a migration of immature MCs to infarcted myocardium and their subsequent differentiation. The MC activation after infarction in young rats may result from a more active immune reaction in younger rats and/or functional peculiarities of their MC.

Key words: mast cells, heart, myocardial infarction, rats, postnatal development.