

13. Brestel F., Mc Clain E. A mechanism for inhibition of lumi- nol-dependent neutrophil chemiluminescence by polyanions// J. Immunology. 1983. Vol.131, N5. P.2515-2518.
14. Fligel S., Lee E., Mc Cay J. Protein degradation following treatment with hydrogen peroxide// Amer.J. Pathol.1984. Vol.115, N3.P.418-425.
15. Grant D., Long W., WiPiамson F. Pericellular heparans may contribute to the protection of cell from free radicals// Med.Hypotheses. 1987. Vol.23.P.67-71.
16. Greenwald R.A., Moy W.W. Effect of oxygen-derived free radicals on hyaluronic acid// Arthritis and Rheumatism. 1980. Vol.23. P. 455-458.
17. Ohkawa M., Shikano T., Ueno N. The effect of monocyte-reale- ased oxygen metabolites on colony formation of erythroid progenitor cell// Acta Haematol.jap. 1986. Vol.46, N6. P.1140-1146.
18. Rich 3. N., Kubanek B. The effect of reduced oxygen tension on colony formation of erythropoietic cell in vitro//Br.J. Haematol. 1982. Vol.52. P.579-588.
19. Tavassoli M. Studies on hemopoietic microenviroument//Exp. Hemat. 1975. N 3.P.213-226.
20. Vissers M., Winterbourn C. The effect of oxydants on neutrophil-mediated degradation of glomerular basement membrane collagen // Biochim.et biophys.Acta. Mol.Cell Res. 1986. Vol.889, N 3.P.271-286.

УДК 577.24:616-008:612.603

А.П.Ястребов, С.В. Сазонов

#### РОЛЬ ТУЧНЫХ КЛЕТОК В РЕГУЛЯЦИИ ПРОЦЕССОВ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ КЛЕТОЧНОЙ РЕГЕННЕРАЦИИ

Кафедры патологической физиологии и гистологии, морфологический отдел ЦНИЛ

Особое внимание исследователей, изучающих регенераторные процессы, в настоящее время привлекают механизмы регуляции осуществляющиеся на клеточном уровне. Анализ накопленных данных позволяет сделать вывод, что при всей важности и значении регуляторов более высоких уровней их влияние определяется на уровне клетки и ее микроокружения. Наиболее изученной является роль микроокружения в регуляции пролиферативных процессов при экстремальных воздействиях на организм в красном костном мозге. Показано, что кроветворная функция в значительной степени определяется межклеточными взаимодействиями в костномозговой ткани, а также взаимодействиями гемопоэтических клеток-предшественников с ростковыми факторами их микроокружения. Среди последних показана особая роль гликопротеиновых конъюгатов в формировании гемопоэзиндуцирующего микроокружения, а также их место в перестройке кроветворения в условиях действия экстремальных факторов [5,6].

В то же время, многие вопросы, касающиеся участия элементов микроокружения в регуляции регенераторных процессов, остаются неясными. Так нет объяснения быстрым изменениям концентрации гликопротеинов в тканях при экстремальных воздействиях на организм. Не разработаны вопросы их значения в тканях отличных от гемопоэтической по строению, клетки которых не имеют полноценного микроокружения (в первую очередь разнообразные типы эпителиальных тка-

ней). Между тем имеются данные, свидетельствующие о важной роли основного вещества микрорайона эпителиальных клеток со всем многообразием его межклеточных взаимодействий в выполнении ими разнообразных функций. Хотя роль отдельных компонентов этого микрорайона в регуляции пролиферативных процессов до сих пор не определена.

Особое место в системе межклеточных взаимодействий микрорайона при развитии регенераторного процесса, по-видимому, занимают тучные клетки, которые обладают по сравнению с другими клеточными популяциями значительной морфофункциональной гетерогенностью, участвуют в обмене веществ с разнообразными биологическими свойствами (гликозаминогликанов, гистамина), имеют все признаки местного биологического регулятора и тонко реагируют на изменения в тканях при экстремальных воздействиях. Однако число работ, освещающих роль тучных клеток в развитии регенераторного ответа, связь изменения их метаболизма в поддержании концентрации биологически активных веществ в основном веществе микрорайона в различных тканях организма, незначительно, данные их часто противоречат друг другу, что не позволяет определить их место и роль в регуляции этих процессов.

Цель настоящей работы состояла в изучении морфофункционального состояния тучноклеточной популяции в тканях с различной интенсивностью течения процессов физиологической регенерации. Для этого методом проточной ДНК-цитометрии оценивали пролиферативные процессы в тканях различных органов. Содержание ДНК в клетках измеряли с помощью трехпараметрического проточного цитометра на базе люминесцентного микроскопа ЛЮАМ-И (ЛОМО). Окраску производили в соответствии с общепринятыми принципами [2,9,10]. В каждой пробе измеряли до 5000 клеток. Скорость измерения - от 500 до 800 клеток в секунду. Анализ получаемых ДНК-гистограмм осуществляли в соответствии с основными принципами В. Varlogie. Количественная обработка гистограмм распределения клеток по содержанию ДНК заключалась в расчете доли клеток, находящихся в различных стадиях митотического цикла: G<sub>0</sub>/1, S, G<sub>2</sub>+M [7,8]. Кроме этого, на гистологических срезах из этих же органов выявляли тучные клетки с помощью окраски их гранул основным коричневым [4]. Количество кислых гликозаминогликанов определяли в клетках после окраски акридиновым оранжевым [1] с помощью комплекса ЛЮАМ И-3 (ЛОМО), работающего в режиме флуориметра.

Результаты, полученные при исследовании органов с помощью метода проточной ДНК-цитометрии, представлены в таблице.

Состояние пролиферативных процессов в некоторых органах

Орган	Распределение клеток по		плоидности (%) Величина пролифера тивного пула
	2с-4с	4с	
Красный костный мозг	19,1±1,08	5,7±0,31	25,9±0,58
Тимус	11,5±2,07	4,5±0,27	17,2±1,31
Лимф. узел	10,6±0,36	4,4±0,43	15,8±0,50
Селезенка	1,8±0,15	3,1±0,24	5,1±0,34
Желудок	10,2±0,53	3,5±0,79	14,2±0,57
Тонкая кишка	8,2±0,79	3,7±0,31	12,1±0,82
Печень	2,4±0,39	17,0±1,98	19,5±1,89
Почка	1,4±0,08	3,9±0,54	5,0±0,43

Все исследованные органы на основании полученных данных были разделены на две группы. Основным критерием для разделения служила скорость процессов клеточного обновления в органе. При этом учитывали всю совокупность полученных признаков: митотическую активность, состояние синтетических процессов, величину пролиферативного пула, соотношение между основными составляющими последнего и т.д. При таком подходе в первую группу (органы с высокой скоростью клеточного обновления) вошли: красный костный мозг, тимус, лимфатический узел, эпителий слизистой желудка и тонкой кишки.

В этих органах высокий уровень значений величины пролиферативного пула клеток сопровождается соответствующими значениями митотического индекса, количеством ДНК-синтезирующих клеток (плоидность 2с-4с) и небольшим числом клеток в прекитотическом периоде клеточного цикла (плоидность 4с). Поэтому, несмотря на большие значения величины пролиферативного пула в печеночной ткани, этот орган не вошел в первую группу, так как этот показатель не сопровождается соответствующим увеличением числа клеток, синтезирующих ДНК и вступающих в митотическое деление. Подобное

распределение клеток по плоидности и анализ временных параметров клеточного цикла позволяет отнести рост величины пролиферативного пула клеток печеночной ткани не на счет активности процессов клеточного деления, а говорит о наличии в данной ткани процесса полиплоидизации клеток. Показатели, характеризующие активность пролиферативных процессов в ткани селезенки, оказались сравнительно низкими. Традиционно считается, что селезенка является органом с достаточно напряженным лимфопоезом. Так, по данным Г.В. Харловой в центрах размножения лимфоидных фолликулов митотический индекс может достигать 58% клеток. В то же время вся остальная часть белой и красной пульпы селезенки в плане активности пролиферативных процессов является, по-видимому, достаточно инертной. Митотический индекс стромальных клеток селезенки колеблется в пределах 2,6%, а меченый тимидин включает только 3,3% всех клеток белой пульпы. Красная же пульпа вообще не проявляет какой-либо значительной активности пролиферативных процессов. На основании выше изложенного, вторую группу (органы с низкой скоростью клеточного обновления) составили: печень, почка, селезенка, щитовидная железа, легкое.

При гистохимическом и люминесцентно-цитохимическом исследовании органов обнаружены существенные различия в количестве и локализации тучных клеток (ТК). Можно сформировать четыре группы по их месту нахождения в органе. Первая группа включает в себя органы, в которых большая часть этих клеток сосредоточена в соединительной ткани капсулы. Наибольшее число ТК выявляется в тимусе, где в рыхлой соединительной ткани около капсулы на площади 0,5мм<sup>2</sup> находится 11,1±0,47 тучных клеток. В плотной неоформленной ткани капсулы тимуса этих клеток значительно больше (29,1±1,23 кл/0,5мм<sup>2</sup>). Такой значительной концентрации ТК не встречается ни в одном другом из обследованных органов. Следует отметить, что ТК почти не обнаруживаются в лимфоидной ткани коркового и мозгового вещества тимуса. Очень редко встречаются небольшие по размерам ТК только в субкапсулярной зоне органа. В рыхлой соединительной ткани вокруг лимфатических узлов обнаружено 4,5±0,23кл/0,5мм<sup>2</sup>, в капсуле - 2,4±0,36 кл/0,5мм<sup>2</sup> и в синусах узлов - 3,5±0,37 кл/0,5мм<sup>2</sup>. В лимфоидной ткани фолликулов и мозговых тяжей тучных клеток не определяется. Незначительное число их встречается в соединительной ткани около селезенки (2,0±0,32 кл/мм<sup>2</sup>), очень редко в капсуле, воротах органа и за все исследование не обнаружено их в красной и белой пульпе. Мало ТК и в почке, где они встречаются исключительно в капсуле органа. Во второй группе в органах пище-

варительной трубки (пищевод, желудок, кишечник) значительное число тучных клеток (до  $13,3 \pm 0,63$  кл./ $0,5$  мм<sup>2</sup>) выявляется в подслизистой оболочке и собственной пластинке слизистой. Единичные клетки распадаются в эпителиальном слое. Подобное явление встречается как в многослойном плоском неороговевающем эпителии пищевода, так и в однослойном призматическом каемчатом эпителии тонкой кишки. Количество ТК в рыхлой соединительной ткани вокруг этих органов колеблется от  $3,5 \pm 0,16$  до  $6,6 \pm 0,32$  кл./мм<sup>2</sup>. В органе следующей группы (печень) тучные клетки расположены исключительно в соединительной ткани порталных трактов. Они не встречаются в капсуле органа или его паренхиме. Тучные клетки печени небольших размеров (диаметром до 15 мкм), количество самих клеток ( $1,0 \pm 0,11$  кл. на  $0,5$  мм), по сравнению с другими органами, невелико. К четвертой группе мы отнесли красный костный мозг, в котором тучные клетки находятся непосредственно между клеточными элементами миелоидной ткани и располагаются обычно ближе к эндосту соответствующей кости.

Тучные клетки проявляют значительное разнообразие свойств в различных органах и тканях. Так, несмотря на большое число изучаемых клеток во всех оболочках тонкой кишки, определяемых при окраске основным коричневым, в них не обнаружено количественным люминесцентным способом кислых гликозаминогликанов. Однако в этих же препаратах, в перитонеальных тучных клетках гликозаминогликаны определяются. Отмечается подобное различие в тинкториальных свойствах тучных клеток и в некоторых других органах. Это касается слизистой и подслизистой пищевода и желудка. Так, в пищеводе при окраске основным коричневым выявляется большее число тучных клеток, которые имеют тенденцию к расположению рядом с эпителиальным слоем слизистой, часть из них находится между эпителиальными клетками, что при окраске акридиновым оранжевым не встречается. В слизистой желудка при окраске люминесцентным красителем клеток, содержащих кислые гликозаминогликаны, нет. Однако при окраске основным коричневым небольшое число таких тучных клеток выявляется.

Значительное разнообразие популяции тучных клеток проявляется в их форме и размерах. Так, в рыхлой соединительной ткани органов эти клетки преимущественно округлой или овальной формы, их диаметр колеблется от 15 до 24 мкм. В капсуле органов, в слизистой и подслизистой оболочках органов пищеварительной трубки тучные клетки всегда удлиненной формы, наименьший диаметр достигает 5-10 мкм, наибольший 25 мкм. Наиболее крупные клетки обнаруживаются в капсуле тимуса и среди клеток миелоидной ткани, более мелкие - в капсуле лимфатических узлов, почки. В паренхиме печени (в соединительной ткани порталных трактов) и синусах лимфатических узлов тучные клетки обычно округлой формы и небольших размеров (средний диаметр достигает 15 мкм). Клетки наименьших размеров обнаружены около серозных оболочек органов брюшной полости. Наибольший диаметр перитонеальных тучных клеток достигает 12 мкм, наименьший - 5-7 мкм.

Анализ полученных данных позволяет отметить несколько важных моментов: тучные клетки присутствуют во всех исследованных органах, а по их локализации можно выделить четыре группы (рис. 1).

Однако при анализе состава выделенных групп можно заметить их неоднородность по уровню пролиферативных процессов. Так, в группу с преимущественной локализацией тучных клеток в капсуле вошли органы и с высокой, и с низкой скоростью клеточного обновления.

Более информативным оказался количественный анализ предста-

вительства тучных клеток в исследованных органах (рис. 2).

Рис. 1

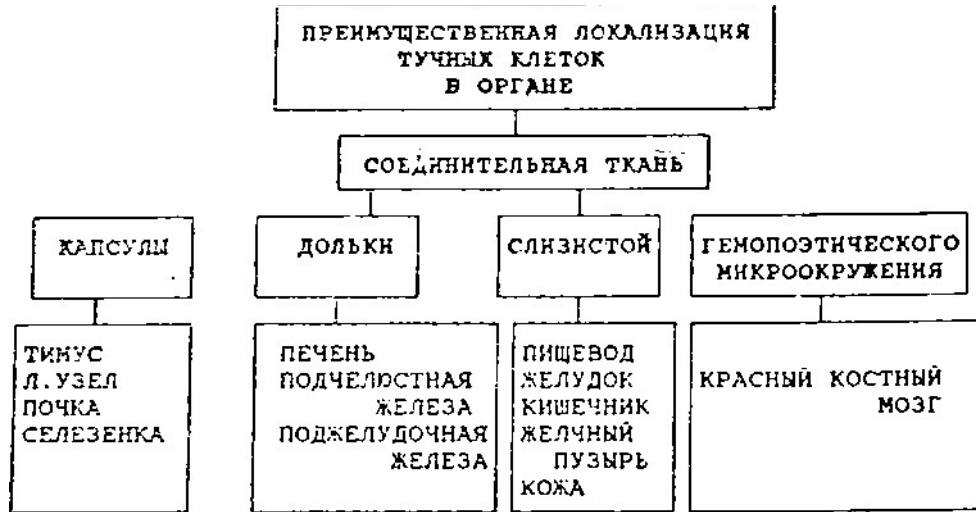
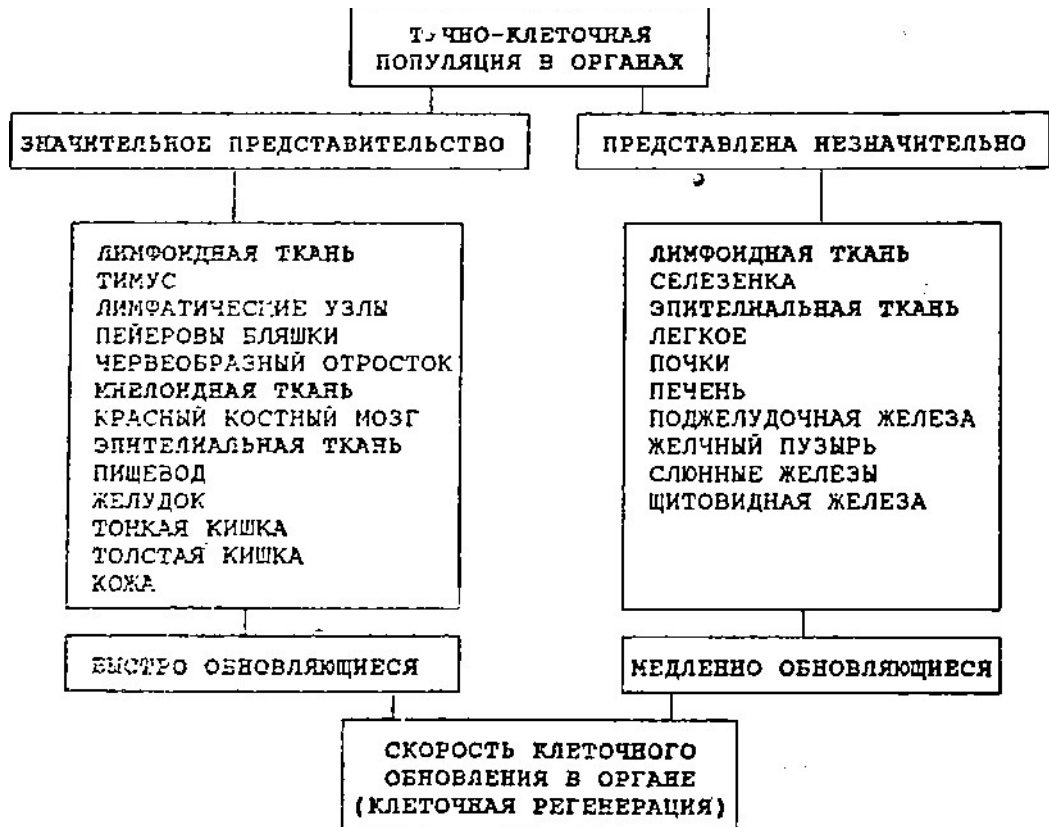


Рис. 2



Как видно из приведенной схемы, прослеживается определенная закономерность: скорость процессов физиологической клеточной регенерации имеет связь с числом тучных клеток в органе. При этом последние, как правило, обнаруживаются около генеративных зон, где происходит наиболее активное клеточное размножение. В цитоплазме тучных клеток цитохимическим методом обнаружены вещества, идентифицированные как кислые ГАГы. При этом их концентрация в этих клетках значительно превышает содержание кГАГ во всех других изученных структурах. Проведенные в нашей лаборатории исследования показали, что изменения содержания кГАГ в ткани при действии экстремальных факторов на организм если не определяют, то, несомненно, модулируют развитие регенераторных процессов [3]. Хорошо изучена и роль кислых гликозаминогликанов в регуляции гемопоэза [5,6]. Приведенные в настоящей работе данные свидетельствуют, что роль этих веществ не ограничивается только гемopoэтической тканью. Кислые гликозаминогликаны, по-видимому, имеют значение в регуляции пролиферативных процессов для более широкого круга органов и тканей. При этом изменение концентрации кГАГ зависит от морфофункционального состояния популяции тучных клеток соответствующего органа.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Зеленин А.В. Люминесцентная цитохимия нуклеиновых кислот. М.: Наука, 1967. 136 с.
2. Розанов Ю.М. Проточная цитометрия/ Методы культивирования клеток. Под ред. Г.П.Пинаева. Л.: Наука. 1983. С. 136-196.
3. Цвиренко С.В., Сазонов С.В., Ястребов А.П. и др. Изменение состояния регенераторных процессов и содержания гликозаминогликанов в ткани печени при экстремальных воздействиях на организм/ Радиационный фактор и здоровье человека на Урале. Сб.научн.трудов. Екатеринбург: Изд-во УГМИ. 1995. С. 158-172.
4. Шубич М.Г., Могильная Г.М. Гликопротеины и протеогликаны. Принципы их гистохимического анализа//Арх.анат.,1979. Т.77, вып.8. С. 92-99.
5. Юшков Б.Г., Попов Г.К., Северин М.В., Ястребов А.П. Гликопротеиды и гемопоэз. Екатеринбург: Изд. УрГМИ, 1994. 127 с.
6. Ястребов А.П., Юшков Б.Г., Большаков В.Н. Регуляция гемо- поэза при воздействии на организм экстремальных факторов. Свердловск: УрО АН СССР, 1988. 152 с.
7. Baisch H., Beck P., Christensen I.J. et al. A comparison of mathematical methods for the analysis of DNA histograms obtained by flow cytometry//Cell Tissue Kinet. 1982. Vol.15. P.235-241.
8. Barlogie B., Spitzer G., Hart J.S. et al. DNA histogram analysis of human hemopoietic cells//Blood.1976. Vol.48. P.245-258.
9. Givan A.L. Flow cytometry: first principles. New York, 1992. 202 P.
10. Taylor W., Milthorpe B.K. An evaluation of DNA fluoroch- romes, staining techniques and analysis for flow cytomet- ry//J.Histochem.Cytochem. 1980. Vol.28. P.1221-1232.