

УДК 297.8:612.356:611-018.52:576.314.63.

НЕКОНТАКТНЫЕ ВЛИЯНИЯ КЛЕТОК МИКРООКРУЖЕНИЯ НА ЭРИТРОБЛАСТЫ В ОЧАГАХ ЭРИТРОПОЭЗА ПЕЧЕНИ АМФИБИЙ

В. А. Шалимов

Институт зоологии НАН Украины, ул. Б. Хмельницкого, 15, 252601 Киев-30, ГСП, Украина

Получено 12 марта 1997

Неконтатні впливи клітин мікрооточення на еритроblastи в осередках еритропоєза печінки амфібій. Шалимов В. О. — В осередках еритропоєзу печінки амфібій взаємодія між клітинами може відбуватися як шляхом тісного контакту плазмолем, так і в безконтактний спосіб, коли клітини знаходяться на значній відстані одна від одної. Дистантний вплив відбувається шляхом передавання в еритроblastи компонентів цитоплазми клітин мікрооточення через кровеносне русло або через цитоплазму інших клітин мікрооточення. При відсутності безпосередніх контактів між клітинами в еритроblastи із клітин мікрооточення потрапляють рибосомально-ліпідні комплекси та пластівчастий матеріал невеликої електронної щільності. **Ключові слова:** печінка амфібій, еритропоєз, клітини мікрооточення, дистантний вплив.

Non-Contact Influence of Microenvironment Cells upon Erythroblasts of Erythropoiesis Focuses in the Amphibian Liver. Shalimov V. A. — Intercellular interaction in the Amphibian liver erythropoiesis focuses may be taken by close plasmolemm contact and by non-contact way as well, when cells are situated at a certain distance one from another. The remote influences are achieved by transmission of the cytoplasm cellular environment components into erythroblasts with blood stream or through the cytoplasm of other micro-environment cells. Under the absence of immediate intercellular contact, erythroblasts receive ribosomal-lipid complexes and flake-like material of low electron density.

Key words: Amphibians, liver, erythropoiesis, micro-environment cells, remote influences.

Влияние клеток микроокружения органов гемопоэза на дифференцировку кроветворных элементов осуществляется при короткодистантных взаимодействиях между ними (Фриденштейн, 1984). Клетки стромы формируют соответствующее микроокружение для гемопоэтических клеток, оплетая их своими отростками (Родионова, 1989). Изучение взаимодействий между стромальными и кроветворными клетками показывает, что, наряду с наличием контактов разного вида путем тесного прилегания плазмолемм, между контактирующими клетками наблюдаются также пальцевидные соединения, образованные глубоким вхождением отростков клеток крови в цитоплазматические углубления стромальных клеток (Старостин, Сатдыкова, 1984). Дифференцирующиеся клетки крови могут располагаться в полостях цитоплазмы гепатоцитов (Федоренко, 1965) или мегакариоцитов (Шевченко, 1975). В кроветворной системе широко распространены также межклеточные коммуникации через щелевые контакты (Rosendaal et al., 1991) и по цитоплазматическим мостикам (Михайловская, 1975; Мажуга, 1978).

Клетки многоклеточного организма могут обмениваться друг с другом различными продуктами жизнедеятельности, в том числе и генетическим материалом (Зенгбуш, 1982). Процесс синтеза РНК в макрофагах и передачи ее в другие клетки имеет широкое распространение в кроветворных органах. Синтезированные в макрофагах лимфатических узлов белки и РНК часто используются не самой клеткой, а передаются в расположенные рядом клетки крови по цитоплазматическим мостикам. Переход этих продуктов при контактных взаимодействиях из макрофагов в лимфоциты хорошо документирован автораднографическим исследованием и цейтраферной микрокинносъемкой живых клеток (Мажуга, 1978). При переходе из клетки в клетку нуклеиновые кислоты выполняют регуляторные функции, индуцируя процессы дифференцировки, развития и адаптации. Из клетки в клетку передаются регуляторные РНК, которые способны вызвать функциональную активность определенных генов или группы генов (Гришок, 1993).

Менее изучены морфологические аспекты процессов неконтатного воздействия клеток микроокружения на дифференцирующиеся клетки крови, когда непосредственное соприкосновение между клетками отсутствует. В данной работе мы не касаемся дистантных межклеточных взаимодействий электромагнитной природы, исследованных В. П. Казначеевым, Л. П. Михайловой (1981) и другими авторами.

Задачей нашего исследования является изучение на светооптическом и электронномикроскопическом уровнях неконтатных взаимодействий между эритроblastами и клетками микроокружения печени амфибий в процессе эритропоэза.

Материал и методы исследования. Изучение эритропоэза проводилось в печени бесхвостых амфибий (*R. ridibunda*, *R. lessonae*), которые отлавливались в окрестностях г. Киева (р-н Феофания).

У изучаемых животных проводился отбор кусочков печени для гистологического и электронномикроскопического исследований. Для гистологического исследования материал фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине, обезжизивали в спиртах и заливали в парафин. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Для электронномикроскопического исследования образцы печени фиксировали в 2,5%-ном растворе глутаральдегида и в 2%-ном растворе OsO_4 ; после обезжизивания исследуемый материал заливали в аралдит. Ультратонкие срезы контрастировали растворами цитрата свинца и уранилацетата, затем исследовали под электронным трансмиссионным микроскопом "Тесла БС-500".

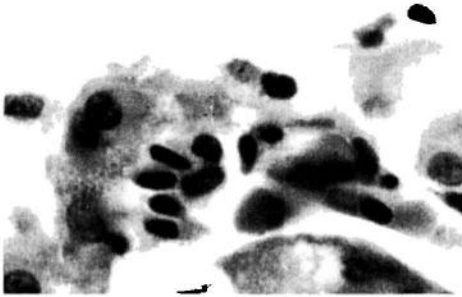


Рис. 1. Эритробласты различной степени зрелости в очаге гемопоэза субкапсулярной зоны печени лягушки. Световая микроскопия. Окраска гематоксилином и эозином. Об. $\times 90$, ок. $\times 7$.

Fig. 1. Different maturity degree erythroblasts in a sub capsular zone of the frog liver haemopoiesis focus. Light microscopy. Stained with haematoxylin and eosin. Objective $\times 90$, eyeglass $\times 7$.

Результаты исследования и их обсуждение. У амфибий очаги эритропоэза локализируются в различных участках печени. Небольшие скопления эритроидных клеток различной степени зрелости постоянно обнаруживаются в субкапсулярной области, где они располагаются на небольшом расстоянии друг от друга (рис. 1). Это позволяет расценивать дифференцировку клеток красной крови амфибий в данной зоне печени как очаговую, не разделенную пространственно на отдельные этапы. Следует отметить, что данное утверждение относится только к начальным этапам дифференцировки эритробластов, поскольку у амфибий созревание клеток эритроидного ряда не заканчивается в органах гемопоэза, а продолжается в различных отделах кровеносного русла. В крови лягушек, кроме зрелых ядерных эритроцитов, постоянно обнаруживаются базофильные и полихроматофильные эритробласты (Гольдберг и др., 1973).

При изучении субкапсулярно расположенных очагов гемопоэза с помощью электронного микроскопа между соседними эндотелиальными клетками обнаруживаются широкие межклеточные промежутки, что позволяет плазме крови и клеточным элементам свободно достигать гепатоцитов. Тесные контакты гепатоцитов друг с другом препятствуют переходу крови в окружающие ткани. Гепатоциты, прилежащие к очагам гемопоэза, по своим ультраструктурным признакам являются активно функционирующими клетками. Большая площадь эухроматина их ядер, видимо, связана с активными процессами синтеза и-РНК. В цитоплазме этих клеток имеются многочисленные рибосомы, но отсутствует развитый шероховатый эндоплазматический ретикулум, и морфологическими методами не выявляется накоплений белкового или иного про-

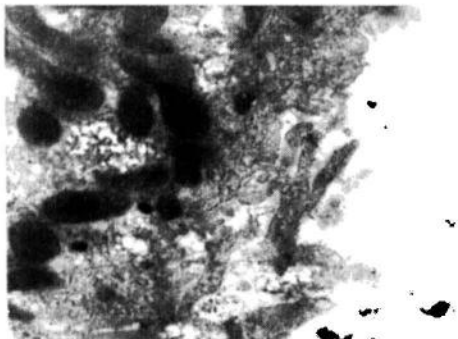
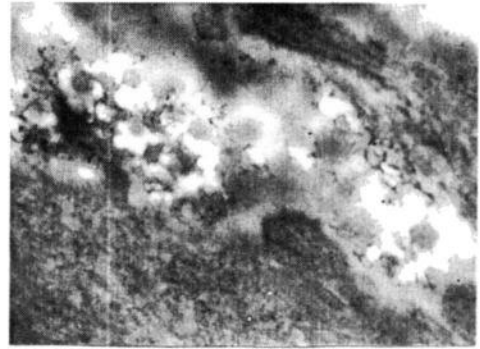


Рис. 2. Наличие большого количества митохондрий с электронно-плотным матриксом в участке цитоплазмы гепатоцита, расположенном в непосредственной близости от очага эритропоэза печени амфибии. Электронная микрофотография. Ув. 12000.

Fig. 2. Presence of abundant mitochondria with electronically dense matrix in a hepatocyte cytoplasm part immediately close to the erythropoiesis focus of an amphibian liver. Electron microphotograph, $\times 12\ 000$.

Рис. 3. Непосредственный переход фибриллярных структур цитоплазмы гепатоцита в периферическую зону частиц округлой формы, расположенных вне клетки. Печень амфибии. Электронная микрофотография. Ув. 14000.

Fig. 3. Immediate transition of a hepatocyte cytoplasmic fibrillar structures into peripheral zone round shaped out of cell particles. Amphibian liver. Electron microphotograph, $\times 14000$.



дукта. Довольно многочисленные митохондрии расположены во всех отделах цитоплазмы, но наибольшее их количество определяется в участках клеток, обращенных к очагу эритропоза (рис. 2). Наличие электронно-плотного матрикса митохондрий свидетельствует об их высокой функциональной активности. В указанных отделах гепатоцитов цитоплазма теряет свое типичное строение. Отдельные ее участки превращаются в бесструктурную массу невысокой электронной плотности, среди которой нечетко определяются крупные овальной или округлой формы гранулы несколько большей электронной плотности. Другая часть цитоплазмы имеет вид фибрилл с расположенными на них очень мелкими гранулами, сходными по морфологии с рибосомами. Фибриллярные структуры выходят за пределы цитоплазмы гепатоцитов и, вступая в контакт с описанными выше крупными округлой формы гранулами, формируют их периферический фибриллярно-гранулярный слой (рис. 3). Плазмолемма гепатоцитов в этих участках не определяется. Неклеточная фракция крови почти целиком заполнена многочисленными подобными структурами (рис. 4). Центральные отделы их имеют вид однородных гранул овальной формы невысокой электронной плотности, от которых во все стороны отходят тонкие фибриллы с расположенными на них в виде четок рибосомами (рис. 5). Центральные части описываемых структур по электронно-микроскопическим признакам имеют определенное сходство с липидными гранулами. Наличие морфологических признаков трансформации компонентов цитоплазмы гепатоцитов в овальной формы структуры позволяет предположить участие гепатоцитов в формировании указанных структурных образований плазмы крови очагов эритропоза.

Базофильные эритробласты в очагах кроветворения субкапсулярной области печени определяются по наличию в их цитоплазме большого количества рибосом и полирибосом. Они имеют небольшие по размерам ядра с довольно значительной площадью конденсированного хроматина. Появление в периферических отделах цитоплазмы небольших участков фибриллярных структур, характерных для полихроматофильных эритробластов, свидетельствует об активном функционировании аппарата белкового синтеза в этих клетках. В цитоплазме базофильных эритробластов имеется большое количество округлой формы образований, окруженных рибосомами и тонкими фибрил-

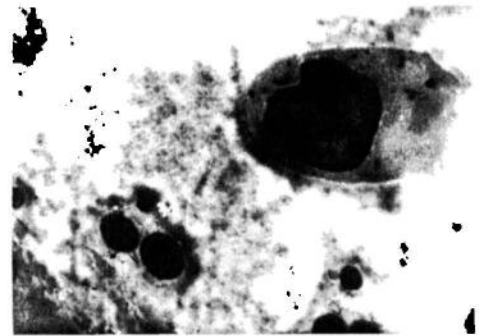


Рис. 4. Мелкие округлой формы образования в плазме крови очага эритропоза печени амфибии. Электронная микрофотография. Ув. 4600.

Fig. 4. Small round-shaped structures in the erythropoiesis blood plasma focus in Amphibian liver. Electron microphotograph, $\times 4600$.

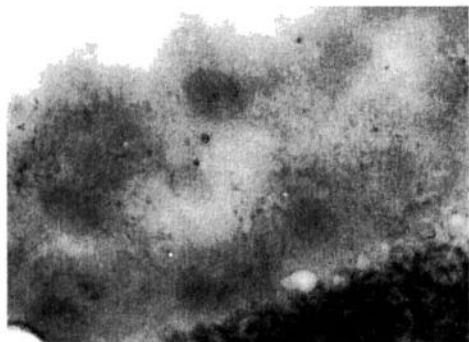


Рис. 5. Структурные образования плазмы крови очага эритропоза, состоящие из центральной части овальной формы и отходящих от них многочисленных фибрилл с мелкими гранулами. Печень амфибии. Электронная микрофотография. Ув. 24000.

Fig. 5. Blood plasma structures consisting of ovate central part and projecting numerous fibrils with small granules. Amphibian liver. Electron microphotograph, $\times 24\ 000$.

лярными структурами. Структурные образования не клеточной фракции крови очагов кроветворения несомненно идентичны округлой формы структурам цитоплазмы базофильных эритробластов, находящимся в этих же очагах (рис.6). Поступая из крови очага в цитоплазму эритробластов, они включаются в синтез их цитоплазматических белков. Незначительная функциональная активность ядер базофильных эритробластов субкапсулярных очагов эритропоза печени, видимо, связана с поступлением извне большого количества рибосом и других компонентов, необходимых для синтеза цитоплазматических белков. Неклеточная часть крови очагов гемопоэза амфибий, насыщенная подобными комплексами, вероятно, способствует значительному ускорению процесса дифференцировки клеток красной крови. Но описываемый процесс довольно расточителен, т.к. часть продуктов синтеза гепатоцитов может не достичь эритробластов и с током крови покинуть очаги гемопоэза печени.

Механизм переноса компонентов цитоплазмы гепатоцитов в очаги эритропоза имеет определенное сходство с процессом клазматоза. Процесс формирования выступов цитоплазмы гепатоцитов и обособления их в самостоятельные фрагменты, мигрирующие в пространство Диссе или в просвет желчных капилляров, подробно изучен М. М. Калашниковой (1985). В составе фрагментов цитоплазмы — клазматозом — могут находиться цепочки и розетки рибосом, фрагменты митохондрий и отдельные микроворсинки. Процесс клазматоза в гепатоцитах широко распространен у позвоночных и наблюдался М. М. Калашниковой (1985) у рыб, земноводных, птиц и млекопитающих. Активность клазматоза значительно возрастает как при патологических состояниях, так и при интенсификации физиологических процессов: при действии на организм повреждающих факторов (CCl_4), при активации желчеотделения, при голодании и т.д. Участие фрагментов цитоплазмы гепатоцитов в эритропозе М. М. Калашниковой не изучалось. Отличие процесса клазматоза от описанного нами перехода компонентов цитоплазмы гепатоцитов в плазму крови очагов эритропоза состоит в том, что в процессе клазматоза образуются фрагменты цитоплазмы, окруженные плазмолеммой, а в наших наблюдениях — формируются однотипные гранулярно-фибриллярные структуры, не окруженные мембраной.

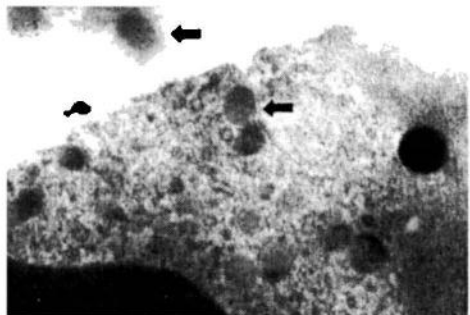


Рис. 6. Наличие в цитоплазме базофильного эритробласта овальной формы образований (стрелка), сходных по структуре с гранулярно-рибосомальными комплексами плазмы крови (стрелка). Печень амфибии. Электронная микрофотография. Ув. 14000.

Fig. 6. Presence in the cytoplasm of the basophilous oval-shaped erythroblast structures (arrow), structurally similar to granular-ribosomal blood plasma complex (arrow). Amphibian liver. Electron microphotograph, $\times 14\ 000$.

В центральных отделах печень амфибий имеет типичное балочное строение, образованное двумя рядами гепатоцитов, отделенных от просветов синусоидов эндотелиальными и купферовскими клетками. Иногда встречаются небольшие группы гепатоцитов (по 2–3–4 клетки), окруженные со всех сторон эритробластами, эндотелиальными клетками и макрофагами. Очаги эритропоэза передко располагаются в сосудистом русле без непосредственных контактов эритробластов с гепатоцитами. Эти два типа клеток обычно разделяются слоем клеток эндотелиальной выстилки капилляров. В некоторых участках синусоидов отростки эндотелиальных клеток имеют незначительную ширину и часто не определяются при светооптическом исследовании. Участки цитоплазмы клеток эндотелия, разделяющие эритробласты и гепатоциты, содержат большое количество мелких пузырьков с хлопьевидным содержимым. Содержимое микроворсинок гепатоцитов, вероятно, поступает в пузырьки клеток эндотелия и переносится ими в цитоплазму эритробластов, т.к. структурная целостность вершин некоторых микроворсинок в зоне их непрямого взаимодействия с эритробластами нарушена.

Подобный механизм взаимодействия гепатоцитов с эритробластами через цитоплазму эндотелиальных клеток значительно отличается от передачи материалов цитоплазмы гепатоцитов в клетки красной крови через кровеносное русло, которая имеет место в субкапсулярных очагах эритропоэза. Непрямой способ передачи менее расточителен, т.к. частицы цитоплазмы гепатоцитов не поступают в просветы сосудов.

Выводы. 1. В очагах эритропоэза печени амфибий клетки микроокружения могут вступать в тесные контакты с эритробластами, но широко распространены также и неконтактные виды взаимодействия между ними.

2. Дистантное воздействие осуществляется путем передачи в эритробласты компонентов цитоплазмы клеток микроокружения через кровеносное русло или через цитоплазму других клеток микроокружения.

3. При отсутствии непосредственного соприкосновения из клеток микроокружения в эритробласты поступают рибосомально-липидные комплексы и малоструктурированный хлопьевидный материал.

Гольдберг Д. И., Гольдберг Е. Д., Шубин Н. Г. Гематология животных. — Томск: Изд-во Том. ун-та, 1973. — 180 с.

Гришок А. А. Внеклеточные нуклеиновые кислоты как возможные медиаторы морфогенетической функции иммунной системы. Гипотеза об обмене регуляторными молекулами между клетками организма // Биополимеры и клетка. — 1993. — 9, № 6. — С. 5–12.

Казначеев В. П., Михайлова Л. П. Сверхслабые излучения в межклеточных взаимодействиях. — Новосибирск: Наука, 1981. — 143 с.

Калишичкова М. М. Явления клазматоза в печени в норме и при патологии // Бюл. экспер. биологии и медицины. — 1985. — № 9. — С. 355–358.

Мажуга П. М. Кровеносные капилляры и ретикуло-эндотелиальная система костного мозга. — Киев: Наук. думка, 1978. — 192 с.

Михайловская Э. В. Наблюдения за живыми клетками лимфатического узла с помощью кинокамеры // Дифференцировка клеток и органогенезах: Материалы III Всесоюз. симпоз. — Киев, 1975. — С. 53–56.

Родионова Н. В. Функциональная морфология клеток в остеогенезе. — К: Наук. думка, 1989. — 185 с.

Старостин В. И., Сандыкова Г. П. Ультраструктурная характеристика стромальных макрофагов и их взаимодействие с кроветворными клетками и регенерирующими трансплантатах костного мозга // Арх. анатом., гистол. и эмбриол. — 1984. — 87, № 9. — С. 41–47.

Федоренко Н. Н. Некоторые новые данные о ходе кроветворения в печени у эмбрионов и плодов человека // Вопр. морфол. и клинич. медицины. — Ставрополь, 1965. — С. 54–58.

Фриденштейн А. Я. Влияние микроокружения на пролиферацию и дифференцировку кроветворных клеток // Иммунологические аспекты биологии развития. — М.: Наука, 1984. — С. 57–66.

Шевченко Ж. Т. Морфологическая характеристика мегакариоцитов развивающегося костного мозга белых крыс // Дифференцировка клеток в гисто- и органогенезах: Материалы III Всесоюз. симп. — Киев: Наук. думка, 1975. — С. 76–79.

Зенбуш П. Молекулярная и клеточная биология. — М.: Мир, 1982. — Т. 3. — 344 с.

Rosendaal M., Gegan A., Green C. R. Direct cell-cell communication in the blood-forming system // Tissue and Cell. — 1991. — 23, № 4. — P. 457–470.