

УДК 612.112.9: 591.169.2: 612.35: 612.119

© Ю.С. Храмцова, О.С. Арташян, Б.Г. Юшков, 2012.

МОРФОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ФУНКЦИЯ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК ПРИ РЕПАРАТИВНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ ТКАНЕЙ С РАЗНОЙ ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЙ СПОСОБНОСТЬЮ

Ю.С. Храмцова, О.С. Арташян, Б.Г. Юшков*Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, лаборатория иммунофизиологии и иммунофармакологии (зав. – проф. Б.Г. Юшков), г. Екатеринбург.*

MORPHOGENETIC FUNCTION OF IMMUNOCOMPETENT CELLS AT REPARATIVE REGENERATIONS OF TISSUES WITH DIFFERENT REGENERATIVE ABILITY

Y.S. Hramtsova, O.S. Artashyan, B.G. Yushkov

SUMMARY

It is shown that lymphocytes and mastocytes take part in regulation of reparative regeneration of a liver and a blood. Activation of immune system leads to acceleration of processes of regeneration irrespective type of the damaged tissue.

МОРФОГЕНЕТИЧНА ФУНКЦІЯ ІМУНОКОМПЕТЕНТНИХ КЛІТОК ПРИ РЕПАРАТИВНОЇ РЕГЕНЕРАЦІЇ ТКАНИН З РІЗНОЮ ВІДНОВНОЮ ЗДАТНІСТЮ

Ю.С. Храмцова, О.С. Арташян, Б.Г. Юшков

РЕЗЮМЕ

Показано, що в регуляції репаративної регенерації печінки і кровотворної тканини беруть участь лімфоцити і оградні клітки. Активація імунної системи приводить до прискорення процесів регенерації незалежно від типу пошкодженої тканини.

Ключевые слова: репаративная регенерация, печень, кроветворная ткань, лимфоциты, тучные клетки.

Проблема регенерации тканей является одним из ключевых вопросов биологии. Этот процесс обеспечивает тканевой гомеостаз в физиологических условиях и восстановление утраченных структур, нарушенных функций при повреждении.

Вместе с тем многие механизмы регенераторного процесса и особенно его регуляция остаются недостаточно изученными. Признается, что в этом процессе центральное место занимает лимфоцит [2]. Имеющиеся данные указывают на то, что реализация морфогенетической функции лимфоцитами происходит аналогично реализации их иммунологической активности за счет клеточных контактов и продукции цитокинов.

Однако имеются отдельные указания, что в регуляции регенераторного процесса принимают участие не только лимфоциты, но и другие элементы иммунной системы. Так, при стимуляции клеток Купфера ход регенерации гепатоцитов ускоряется, а при торможении их поглотительной способности до частичной резекции печени или в первые часы после нее замедляется [4]. На участие нейтрофилов в регуляции регенераторного процесса указывают И.И. Долгушин и О.В. Бухарин [3]. Кроме этого, тучные клетки участвуют в регенераторном процессе, вызывая фиброз ткани, ингибируя пролиферацию фибробластов и усиливая их дифференцировку, а также синтез коллагена. Они выделяют факторы роста новых капилляров, участвуют в ангиогенезе,

выделяют факторы, привлекающие лимфоциты, нейтрофилы, макрофаги, тромбоциты, моноциты и эозинофилы [5].

Таким образом, в настоящее время показано, что разные элементы иммунной системы принимают участие в регуляции регенераторного процесса. Несмотря на все выше приведенные данные, доказанным является лишь существование данного феномена, а многие проблемы морфогенетической функции иммунной системы, еще далеки от своего решения. Расшифровка механизмов этой функции создает теоретическую основу для разработки целенаправленного на нее воздействия. В этом направлении имеются лишь единичные исследования. Все известные на сегодняшний день иммунокорректоры изучены с точки зрения их влияния на показатели иммунного статуса. Данные, касающиеся влияния их на морфогенетическую функцию, в литературе отсутствуют. В то же время, использование этих препаратов позволит отобрать наиболее эффективные в терапевтическом плане препараты и предложить принципиально новые пути для стимуляции восстановительных процессов.

В связи с вышесказанным, целью настоящей работы является исследование роли иммунокомпетентных клеток в регуляции репаративных процессов в тканях с разной восстановительной способностью.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве экспериментальных животных использовали 120 белых беспородных крыс. Состояние регенераторных процессов изучали в 2-х типах тканей: печень и кровь, обладающими разными типами восстановительных процессов и скоростями физиологической регенерации, на модели репаративной регенерации, которую вызывали частичной гепатэктомией, либо массивной кровопотерей в объеме 2% от массы тела. Для изменения функционального состояния иммунной системы непосредственно за час до операции внутримышечно вводили иммунокорректор полиоксидоний в дозе 0,1 мг/кг.

Исследования печени проводили через 4 или 17 часов после операции. Для оценки степени выраженности регенерационного процесса в печени использовали следующие показатели: масса регенерирующей печени; коэффициент массы печени – масса печени, приходящаяся на 1 г. массы тела животного; митотический индекс – количество митозов на 1000 гепатоцитов; количество двуядерных клеток на 1000 гепатоцитов; размеры гепатоцитов; ядерно-цитоплазматический индекс; количество гепатоцитов на площади 1 мм²; удельное количество лимфоцитов на площади 1 мм².

Оценку регенерации кроветворной ткани проводили по показателям периферической крови и костного мозга. Периферическую кровь исследовали с помощью гематологического анализатора Micros 60 фирмы ABX diagnostic. В костном мозге определяли общее количество миелокариоцитов, а также подсчитывали миелограмму.

Морфогенетическую функцию лимфоидных клеток исследовали в модели адаптивного переноса по выраженности регенераторных процессов в органе, одноименному поврежденному в организме донора. Лимфоидные клетки (спленоциты или тимоциты) получали от доноров через 4 или 17 часов (донорский интервал) после частичной гепатэктомии или кровопотери. Указанные донорские интервалы были выбраны в связи с тем, что на данные сроки лимфоидные клетки донора обладают наибольшими стимулирующими свойствами.

Из лимфоидных клеток донора готовили суспензию по методу Н.А. Краскиной, для чего ткань селезенки массой 150-300 мг. или весь тимус смешивали с 5 мл среды 199 на холоде. Ткани измельчали ножницами и пропускали через инъекционные иглы уменьшающегося диаметра. Производили подсчет ядер клеток в камере Горяева с использованием лейкоцитарного меланжера. Число жизнеспособных клеток определяли с помощью окраски клеток 0,1% раствором трипанового синего. Конечную концентрацию клеток в суспензии доводили до 60-80*10⁶ в 1 мл. Указанное количество спленоцитов или тимоцитов

вводили реципиентам внутривенно (в хвостовую вену).

Состояние регенераторных процессов в печени или костном мозге реципиентов оценивали через 48 часов после трансплантации лимфоидных клеток.

На гистологических срезах, окрашенных Азуром П и Основным коричневым, выявляли тучные клетки, оценивали их плотность на единицу площади ($S=1 \text{ мм}^2$) и функциональную активность [1].

Обработку результатов проводили на основе методов вариационной статистики с применением параметрического критерия Стьюдента и непараметрического критерия Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные подтверждают гипотезу о том, что печень и кроветворная ткань отличаются не только по характеру физиологической регенерации, но и по течению репаративной. Так, в репаративной регенерации печени можно выделить 2 фазы: деструктивно-реактивную и пролиферативную, в то время как в костном мозге имеет место интенсификация идущих и в физиологических условиях процессов. Вместе с тем, состояние иммунной системы существенно влияет на репаративную регенерацию независимо от вида поврежденной ткани и этот эффект наиболее выражен по отношению к тому типу регенерации, который преобладает в ней.

Важным показателем восстановления органа является изменение его массы, о чем судили в случае печени по массе регенерата, а кроветворной ткани – клеточности костного мозга бедренной кости. При стимуляции иммунной системы полиоксидонием масса сохраненной печени в деструктивно-реактивную фазу регенерации в отличие от контроля не только не уменьшается, но даже возрастает, а клеточность костного мозга через 17 часов после кровопотери превышает показатель животных, не получавших препарат (с 28±4,16 млн./100 г. массы тела до 63,3±1,32 млн./100 г. массы тела).

В качестве ключевых показателей внутриклеточной регенерации большинство исследователей признают ядерно-цитоплазматический индекс и наличие двуядерных клеток, а клеточной – количество митозов. При оценке регенераторных процессов было обнаружено, что после резекции печени при стимуляции иммунной системы полиоксидонием усиливается преимущественно внутриклеточный тип, о чем свидетельствует резкое увеличение количества двуядерных клеток (Табл. 1), в то время как в костном мозге активируется главным образом клеточный тип регенерации – отмечается более выраженные гиперплазия эритроидного и гранулоцитарного ростков и более ранний ретикулоцитоз.

Введение животным полиоксидония в значительной степени влияет на содержание лимфоцитов в регенерирующих тканях. Так, при частичной гепатэктомии отмечается лимфоцитарная инфильтрация печени, в наибольшей степени выраженная в деструктивно-реактивную фазу в участках, примыкающих к зоне оперативного вмешательства, и еще в большей степени увеличивающаяся при активации иммунной системы (Табл. 1). Однако следует отметить, что развивающаяся в первые 4-6 часов после

кровопотери лимфоцитарная инфильтрация костного мозга при стимуляции иммунной системы отсутствует (с $7,99 \pm 0,65$ млн./100 г. массы тела до $1,58 \pm 0,54$ млн./100 г. массы тела), что может свидетельствовать о существенном влиянии на регенерацию крови функционального состояния внутри-костномозговых лимфоцитов. Причем в обоих случаях, лимфоцитарная инфильтрация поврежденного органа сопровождается развитием лимфопении в периферической крови.

Таблица 1

Гистологические показатели печени крыс после частичной гепатэктомии и крыс-реципиентов лимфоидных клеток

Показатели	Интактные животные	Крысы после частичной гепатэктомии (доноры)	
		контроль	при введении полиоксидония
Количество двуядерных клеток, ‰	$15,4 \pm 1,43$	$22,5 \pm 1,32^*$	$101 \pm 1,64^{* **}$
Ядерно-цитоплазматический индекс	$0,27 \pm 0,006$	$0,35 \pm 0,015^*$	$0,397 \pm 0,015^*$
Митотический индекс, ‰	$0,52 \pm 0,33$	0	$0,43 \pm 0,2$
Количество лимфоцитов на 1 мм^2	75 ± 7	$182 \pm 17^*$	$318 \pm 14^{* **}$
		Реципиенты лимфоидных клеток	
Количество двуядерных клеток, ‰	$15,4 \pm 1,43$	$21,75 \pm 1,79^*$	$79,75 \pm 3,57^{* **}$
Ядерно-цитоплазматический индекс	$0,27 \pm 0,006$	$0,334 \pm 0,005^*$	$0,35 \pm 0,013^*$
Митотический индекс, ‰	$0,52 \pm 0,33$	0	0
Количество лимфоцитов на 1 мм^2	75 ± 7	$252 \pm 32^*$	$215 \pm 21^*$

Примечание: * - различия с интактными животными достоверны при $p < 0,05$, ** - различия с контролем достоверны при $p < 0,05$.

Тучные клетки, также как и лимфоциты, принимают участие в регуляции регенерации печени после частичной гепатэктомии, главным образом, стимулируя внутриклеточные регенераторные процессы, развитие отека органа и миграцию лимфоцитов. Уже через 4 часа, в деструктивно-реактивную фазу, в печени возрастает число тучных клеток (с $83,08 \pm 19,2$ до $269 \pm 11,93$), в пролиферативную фазу (через 17 часов) количество тучных клеток несколько снижается ($162,4 \pm 6,96$), при этом, морфологически они отличаются от мастоцитов печени у интактных животных, что подтверждает факт миграции их извне. Функциональная активность тучных клеток остается высокой. Вероятно, мастоциты представляют собой систему клеток быстрого реагирования, и непосредственно после повреждения они мигрируют в орган, дегранулируют, секретируя огромное количество биологически активных веществ, направленных на поддержание нарушенного гомеостаза поврежденного органа.

При кровопотери количество тучных клеток в костном мозге не меняется. Но наблюдаются заметные сдвиги качественного состава. Снижается степень их дегрануляции (с $18,26 \pm 0,21\%$ до $13,6 \pm 0,12\%$). Таким образом, тучные клетки костного мозга реагируют на кровопотерю лишь дегрануляцией (при этом не происходит полного разрушения клеток) без заметного изменения их числа.

Наблюдаемая активация регенераторных процессов у животных со стимулированной иммунной системой может быть связана как с непосредственным эффектом препарата на ткань, так и влиянием на нее лимфоидных клеток. Для проверки последнего предположения была использована модель адоптивного переноса.

Установлено, что лимфоциты животных доноров, леченных полиоксидонием, приобретают способность в большей степени активировать процессы внутриклеточной регенерации печени у реципиентов, о чем свидетельствует увеличение

размеров ядер и числа двуядерных клеток (Табл.1).

В случае же кровопотери лимфоидные клетки уже на ранние сроки (4 часа) способны активировать эритропоэз у реципиентов, о чем свидетельствует развитие ретикулоцитоза и гиперплазия эритроидного ростка, в отличие от контрольных лимфоидных клеток.

ВЫВОДЫ

1. Независимо от вида поврежденной ткани иммунная система приобретает морфогенетическую функцию. Это свойство характерно не только для циркулирующих лимфоцитов, но и для клеток лимфоидных органов (тимуса и селезенки).

2. Иммунная система выступает не только в качестве одного из индукторов, запускающих регенерацию, но и регулирует этот процесс, изменяя выраженность процессов клеточной или внутриклеточной регенерации, характерных для данного периода. При этом спленоциты и тимоциты способны вызывать в организме реципиента изменения аналогичные таковым в поврежденных тканях доноров.

3. Функциональное состояние иммунной системы играет важную роль в регуляции восстановления тканей. Так, активация иммунной системы приводит к ускорению процессов регенерации независимо от типа поврежденной ткани.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арташян О.С. Система тучных клеток при действии на организм экстремальных факторов // Автореф. дис. канд. биол. наук. Екатеринбург, - 2006, - 23 с.
2. Бабаева А.Г. Регенерация: факты и перспективы. - М.: Издательство РАМН, 2009. – 336 с.
3. Долгушин И.И., Бухарин О.В. Нейтрофилы и гомеостаз. – Екатеринбург: УрО РАН, 2001. -713с.
4. Черешнев В.А., Юшков Б.Г., Климин В.Г., Лебедева Е.В. Иммунофизиология. – Екатеринбург: УрО РАН, 2002. - 260с.
5. Chujo S., Shrasaki F., Kawara S., Inagaki Y., Kinbara T., Inaoki M., Takigawa M., Takehara K. Connective tissue growth factor causes persistent proalpha2(I) collagen gene expression induced by transforming growth factor-beta in a mouse fibrosis model // J. Cell Physiol. - 2005. - vol. 203. - № 2. – 447 - 456.