

Отдельными авторами высказывается предположение, что антитела при определенных условиях могут блокировать взаимодействие эффекторов противоопухолевого иммунитета с клетками-мишенями опухоли, тем самым благоприятствуя иммуностимуляции опухолевого роста [6, 12]. Учитывая данный феномен и результаты наших исследований, следует полагать, что в качестве наиболее эффективного препарата для коррекции иммунодефицита, обусловленного химиотерапией ЦФ, целесообразно рассматривать ПО как препарат активирующий преимущественно клеточное звено иммунитета. Следует отметить, что иммунореабилитирующее (иммунопротективное) воздействие полиоксидония реализуется путем повышения продукции Т-лимфоцитами цитокинов, стимулирующих синтез иммуноглобулинов. Полиоксидоний также увеличивает синтез мононуклеарами IL-2, являющегося одним из индукторов функциональной активности цитотоксических клеток, а также IL-1 и факторов некроза опухоли (α и β), играющих ключевую роль в запуске "цитокиннового каскада", обеспечивающего защиту организма от цитостатического воздействия ЦФ [1].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате экспериментальной оценки сравнительной эффективности Т-активина, миелопида и ПО при фармакологической регуляции нарушений иммунного ответа, развившихся при моделировании на животных методики использования ЦФ в режиме повышенной "дозовой плотности", можно заключить, что

иммуномодулирующие свойства полиоксидония наиболее соответствуют потребностям клиники при коррекции данной разновидности иммунодепрессии. В качестве препарата выбора у больных, получающих химиотерапию ЦФ в режиме "высокой плотности" дозы, не исключается использование Т-активина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бережная Н. М., Чехун В. Ф. Система интерлейкинов и рак. – Киев: ДИА, 2000. – 224 с.
2. Забродский П. Ф., Лим В. Г., Мальцева Г. М. и др. Иммунотропные свойства холинэргических веществ / Под ред. П. Ф. Забродского. – Саратов: Научная книга, 2005. – 251 с.
3. Имантаева Г. М. // Аллергол. и иммунология. – 2005. – Т.6. – № 2. – С. 246–247.
4. Нестерова И. В. // Там же. – С. 139–140.
5. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология / Пер. с англ. – М.: Мир, 2000. – 582 с.
6. Савцова З. Д., Шпильова С. I., Тарутинов В. I. // Онкология. – 2000. – № 4. – С. 267–271.
7. Хаитов Р. М., Игнатъева Г. А., Сидорович И. Г. Иммунология. – М.: Медицина, 2000. – 430 с.
8. Хаитов Р. М., Пинегин Б. В. // Иммунология. – 2005. – Т. 26, № 4. – С. 197–201.
9. Цепелев В. Л., Цепелев С. Л., Курупанов С. И. // Бюлл. СО РАМН. – 2003. – №1. – С. 84–86.
10. Argyris B. F. // Immunol. – 1967. – Vol. 99, № 4. – P. 744–750.
11. Fornier M., Norton L. // Breast Cancer Res. – 2005. – Vol. 7. – P. 64–69.
12. Gilewski T., Norton L. // Diseases of the Breasts / Ed. by J. R. Harris and M. E. Lippman. – Philadelphia, 1996. – P. 751–768.

УДК 616–006.04–091.8

О НЕКОТОРЫХ ПАРАМЕТРАХ, ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ДЛЯ ОЦЕНКИ КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ОРГАНОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ

И. П. Шабалкин, И. Г. Богуш, А. С. Ягубов

Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина РАМН, г. Москва

С помощью метода цитофотометрии установлено, что такие параметры, как критерий $K_{\text{фаген}}$ и модальный класс клеток, можно использовать для оценки функционального состояния клеточной популяции.

Ключевые слова: клеточная популяция, цитофотометрия.

ON SOME PARAMETERS USED FOR EVALUATION OF CELL POPULATIONS UNDER DIFFERENT INFLUENCES

I. P. Shabalkin, I. G. Bogush, A. S. Yagubov

Abstract. Cytophotometric method was helpful in establishing that such parameters as K_{genfa} criterion and the modal class of cells can be used for estimation of functional state of cell population.

Key words: cell population, cytophotometry.

Анализ морфо-функционального состояния популяций клеток свидетельствует, что под

влиянием различных факторов может меняться их функциональное состояние [3, 4]. Поскольку

это состояние в значительной степени определяется функциональной активностью генома клеток [3], то, рассматривая клеточную популяцию как систему, состоящую из сообщества функционально активных клеток, можно охарактеризовать процессы, происходящие в ней, по модальному классу, т. е. доминирующей в популяции группе клеток, определив в изучаемой популяции максимальное количество клеток с одной и той же функциональной характеристикой.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Выяснить, какая существует взаимосвязь между модальным классом клеток и морфо-функциональным состоянием популяции в норме и при различных факторах воздействия на организм.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа была проведена на 3 модельных системах:

I – молочная железа мыши в стадии покоя – лактирующая молочная железа кормящей мыши;

II – интактная печень крысы – регенерирующая печень крысы через 6 и 12 ч после частичной гепатэктомии;

III – органы интактного животного (мыши) – органы животного-опухоленосителя после перевивки мышам суспензии опухолевых клеток (рак шейки матки – РШМ).

Во всех экспериментах на срок фиксации брали не менее 5–6 животных соответственно в опыте и контроле.

Для изучения функционального состояния клеток в настоящем исследовании был произведен цитофотометрический анализ клеточных популяций с помощью оценки функциональной активности генома клетки по критерию $K_{\text{фаген}}$ [Там же] и по сдвигу модального класса функционально активных клеток [5].

Критерий $K_{\text{фаген}}$ – коэффициент функциональной активности генома – выведен из отношения величин гистон/ДНК после определения оптической плотности ядра клетки, окрашенного по Фельгену (количественная оценка содержания ДНК в клетке) и нафтоловым желтым S (определение количества гистонов в клетке). Сначала, применив критерий $K_{\text{фаген}}$, анализировали функциональное состояние популяций, строя гистограммы распределения клеток в зависимости от значений $K_{\text{фаген}}$. Далее определяли модальный класс, используя следующий методический прием. Определив минимальные и максимальные значения $K_{\text{фаген}}$ гистограмм опыта и контроля, строили общую гистограмму, куда входили все значения $K_{\text{фаген}}$ клеток. Затем суммарное число всех разрядов гистограммы разделили на 3 равные части, т. е. на 3 разряда. Увеличив таким способом долю клеток, приходящихся на разряд, определяли процентное число клеток опыта и контроля, соответствующих каждому разряду. При этом в каждом эксперименте анализировали не

менее 100 клеток в опыте и контроле соответственно. Все полученные результаты обрабатывались методом вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Из данных табл. 1 можно видеть, что средняя величина $K_{\text{фаген}}$ для популяции клеток лактирующей молочной железы (опыт) имеет значение 1,66 (1,59–1,73), а для молочной железы, находящейся в стадии покоя (контроль), – 1,22 (1,15–1,29). Это значит, что изменение величины $K_{\text{фаген}}$ непосредственно отражает изменение степени функциональной активности генома клетки. Причем полученные результаты указывают на то, что в период лактации наблюдается сдвиг модального класса функционально активных клеток вправо, т. е. в сторону увеличения в популяции количества более дифференцированных, чем прежде (в фазе покоя), клеток. Тот факт, что в новый модальный класс из первого разряда переходит 64 % клеток ($74 - 10 = 64$), свидетельствует, что для синтеза молока требуется достаточно большое количество дифференцированных клеток. Так как молоко – сложная водная эмульсия, в состав которой входят, помимо солей и воды, жиры (триглицериды молока, а также жирные кислоты, являющиеся предшественниками триглицеридов), белки (казеин, лактоглобулины и лактоальбумины), углеводы (в том числе специфический для молока дисахарид – лактоза), то, по-видимому, в процессе синтеза столь многокомпонентного секрета принимают участие несколько групп по-разному специализированных железистых клеток. Эти представления нашли свою поддержку в ряде работ [1, 2, 6 и др.].

По мнению Р. И. Салганика, "одна и та же клетка не способна одновременно реагировать на множество индукторов синтезом множества продуктов и реализацией большого количества разнообразных программ. Реализация действия генетических индукторов – это результаты работы ряда смежных, по-разному специализированных клеток, составляющих вместе своего рода многоклеточный функциональный ансамбль" [2].

Таблица 1

Распределение клеток по величине $K_{\text{фаген}}$ в 1–3 разрядах общей гистограммы сравнения в фазе покоя молочной железы мыши и в период лактации

№ группы	Объект	Среднее значение $K_{\text{фаген}}$	Число клеток общей гистограммы, %		
			1 разряд	2 разряд	3 разряд
1	Молочная железа в покое	1,22 (1,15–1,29)	74*	22	4
2	Лактирующая	1,66	10	74*	16

(21)

	молочная железа	(1,59–1,73)			
--	-----------------	-------------	--	--	--

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3: * – модальный класс клеток.

Таким образом, из полученных данных следует, что наблюдается прямая зависимость между величиной $K_{\text{фаген}}$, сдвигом модального класса клеток вправо и активацией специализированной функции органа. Это указывает на то, что величина $K_{\text{фаген}}$ и модальный класс клеток могут быть объективными показателями, отражающими характер изменения функционального состояния клеточной популяции.

Подтверждением сказанному являются результаты, полученные при анализе II модельной системы (интактная печень – регенерирующая печень).

Известно, что в результате частичной гепатэктомии (ЧГЭ) в печени млекопитающих наступает целая серия биохимических событий, приводящих к вступлению гепатоцитов в митотический цикл. При этом установлено, что через 4–6 ч после ЧГЭ в 1,5–2 раза усиливается синтез РНК и увеличивается интенсивность РНК-полимеразной активности, а через 12–18 ч после ЧГЭ клетки вступают в фазу редупликации ДНК [7]. Интенсификация процессов синтеза нуклеиновых кислот отражает, следовательно, изменение метаболизма в популяции гепатоцитов в условиях экспериментального воздействия на печень. Свидетельством этого процесса служит то, что наблюдается прямая корреляция между увеличением значений $K_{\text{фаген}}$ и активацией регенерации после ЧГЭ (табл. 2). Так, среднее значение $K_{\text{фаген}}$ гепатоцитов, фиксированных через 6 и 12 ч после ЧГЭ, составляет 1,64 (1,60–1,68) и 1,74 (1,70–1,78) соответственно, а в контроле (неоперированная печень) – 1,38 (1,33–1,43) и 1,39 (1,33–1,45) соответственно. При этом через 6 ч после операции (1-я группа сравнения) в популяции гепатоцитов относительно модального класса клеток, приходящегося на 2-й разряд общей гистограммы группы сравнения, наблюдается незначительный сдвиг вправо. Согласно данным литературы [3, 4], это означает, что в изучаемой нами популяции произошло некоторое увеличение доли высококодифференцированных клеток, в основном за счет перехода 23 % низкокодифференцированных клеток из первого разряда в разряды более дифференцированных клеток – 2-й и 3-й.

Аналогичная ситуация наблюдалась и в популяции гепатоцитов через 12 ч после ЧГЭ печени (2-я группа сравнения). Причем сдвиг вправо произошел за счет перехода 22 % клеток из 2-го разряда в основном в 3-й разряд. Надо отметить, что количественно фракции высококодифференцированных клеток, появляющиеся во 2-м и 3-м разрядах через 6 и 12 ч после ЧГЭ печени, прак-

тически равны.

Этот факт свидетельствует, что в активации процесса регенерации печени после частичной резекции, наряду с ранее имевшимися в популяции высококодифференцированными клетками (8–9 %),

Таблица 2

Распределение гепатоцитов в 1–3 разрядах гистограмм разных групп сравнения после ЧГЭ печени крыс

№ группы сравнения	Группы сравнения	Среднее значение коэффициента $K_{\text{фаген}}$	Доля гепатоцитов в гистограммах групп сравнения		
			1 разряд	2 разряд	3 разряд
1	Печень интактной крысы (6 ч)	1,38 (1,33–1,43)	44	47*	9
	ЧГЭ печень (6 ч)	1,64 (1,60–1,68)	21	54*	25
2	Печень интактной крысы (12 ч)	1,39 (1,33–1,45)	33	59*	8
	ЧГЭ печень (12 ч)	1,74 (1,70–1,78)	11	56*	33
3	ЧГЭ печень (6 ч)	1,64 (1,60–1,68)	21	65*	14
	ЧГЭ печень (12 ч)	1,74 (1,70–1,78)	15	68*	18

участвуют еще 22–23 % гепатоцитов, перешедших из 1-го разряда (менее дифференцированных клеток) в разряды высококодифференцированных клеток, которые, по-видимому, вместе с имевшимися 8–9 % берут на себя всю функциональную нагрузку во время репарации органа в этот период. Подтверждением сказанному служит то, что различия в распределении гепатоцитов по разрядам общей гистограммы сравнения ЧГЭ (6 ч) и ЧГЭ (12 ч) крайне незначительны.

Итак, полученные нами данные указывают на то, что при посттравматической регенерации происходит функциональная перестройка клеточной популяции, что связано, по всей вероятности, с переключением работы генома некоторой группы клеток с одного функционального режима на другой [6]. Показателями данного процесса могут служить такие морфологические параметры, как величина $K_{\text{фаген}}$ и появление модального класса клеток с новой функциональной характеристикой.

Ответ на вопрос: "Можно ли использовать названные выше параметры для анализа функционального состояния клеточных популяций органов в системе опухоль-организм?" – был получен нами в процессе изучения действия перевиваемых опухолевых клеток РШМ на органы/ткани животных-опухоленосителей.

Как можно видеть (табл. 3), во всех исследованных органах/тканях клетки РШМ приводят к изменению значений $K_{\text{фаген}}$ и сдвигу вправо мо-

дального класса клеток изученных популяций. Согласно литературным данным [5, 6], этот факт означает появление в изученных популяциях под влиянием опухоли нового модального класса клеток с новой функциональной характеристикой, оцениваемой по величине $K_{\text{фаген}}$.

Таблица 3

Распределение по величине $K_{\text{фаген}}$ клеток органов/тканей животных в пределах 1–3 разрядов общей гистограммы групп сравнения

№ группы сравнения	Группа сравнения	Среднее значение $K_{\text{фаген}}$	Процент клеток общей гистограммы		
			1 разряд	2 разряд	3 разряд
1	Печень (контроль) – печень (опыт)	1,47 (1,43–1,51)	69*	31	–
		1,55 (1,50–1,60)	29	63*	8
2	Костный мозг (контроль) – костный мозг (опыт)	0,90 (0,87–0,93)	90*	10	–
		1,16 (1,10–1,22)	37	51*	12
3	Почка (контроль) – почка (опыт)	1,38 (1,33–1,43)	78*	19	3
		1,60 (1,55–1,65)	24	69*	7
4	Эпителий кишечника (контроль) – эпителий кишечника (опыт)	1,32 (1,23–1,41)	56*	41	3
		1,71 (1,61–1,81)	20	59*	21

Так, если в норме модальный класс клеток приходится на первый разряд общей гистограммы группы сравнения, то в организме-опухоленосителе мы наблюдаем переход наибольшего количества функционально активных клеток в группу, соответствующую клеткам с более высокой, чем прежде, степенью их дифференцировки.

Одна из возможных причин такого влияния опухоли, по всей вероятности, обусловлена тем, что клетки РШМ, связанные с гормональным статусом организма, индуцируют в изученных клеточных популяциях появление умеренно дифференцированных эндокринных клеток. Иначе говоря, опухоль вызывает в изученных клеточных популяциях изменение функционального режима в определенной группе клеток, т. е. включение в работу в этих клетках ранее не функциониру-

вавших генов.

Интересно, что во всех изученных нами случаях изменение функционального состояния клеточных популяций непосредственно связано с появлением в популяции нового модального класса клеток с новой функциональной характеристикой, оцениваемой по величине $K_{\text{фаген}}$. Иначе говоря, новый модальный класс клеток указывает на то, что в популяции произошло изменение степени дифференцировки у достаточно большой группы функционально активных клеток. Переход этой группы клеток на новый функциональный режим, по-видимому, является причиной изменения в органе/ткани концентрации регуляторных факторов. Это, в свою очередь, приводит к изменению работы цепи метаболических процессов в органе или между органами и тканями организма. Из всего сказанного можно прийти к выводу, что как в норме, так и при различных воздействиях на организм (посттравматическая регенерация, опухолевый рост) на клеточно-популяционном уровне работают одни и те же механизмы регуляции, связанные с изменением количества функционально активных клеток [4].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение следует сказать, что, на наш взгляд, главной особенностью полученных данных является то, что обнаружена корреляция между изменением величины $K_{\text{фаген}}$ и сдвигом модального класса клеток изученных популяций, свидетельствующая о возможности использования этих параметров для изучения морфо-функционального состояния популяций как в норме, так и при патологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Савостьянов Г. А. // Морфология. – 2001. – Т. 120, № 5. – С.18–30.
2. Салганик Р. И. // Структура и функции клеточного ядра: тез. V Всесоюз. симп. – Новосибирск, 1975. – С. 41–42.
3. Шабалкин И. П. // Цитология. – 1998. – Т. 40, № 1. – С.106–115.
4. Шабалкин И. П., Минаев В. И., Ягубов А. С. и др. // ДАН. – 1999. – Т. 369, № 4. – С. 568–573.
5. Шабалкин И. П., Богош И. Г., Ягубов А. С. и др. // ДАН. – 2005. – Т. 400, № 4. – С. 553–556.
6. Шабалкин П. И. Цитофотометрический анализ функционального состояния клеточных популяций в норме и при канцерогенезе: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 2005.
7. Field J. E., Mathur S. N., Labrecque d. R. // Amer. J. Physiol. – 1985. – Vol. 249, № 6. – Pt 1. – P.6679–6684.