

УДК: 576.31/535-08:612.112.3:616-002

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ЦИТОМОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭПИТЕЛИОИДНЫХ КЛЕТОК И МАКРОФАГОВ IN VITRO**

Архипов С.А.

*Государственное учреждение Научный центр клинической и экспериментальной медицины СО РАМН, Новосибирск*

**На основе сравнительного цитоморфологического анализа макрофагов и эпителиоидных клеток, формирующихся в культуре, и данных научной литературы рассматриваются вопросы, касающиеся проблемы происхождения эпителиоидных клеток и их морфологической идентификации.**

Известно, что морфологическим проявлением многих гранулематозных болезней является хроническое воспаление с формированием эпителиоидно-клеточных гранул (1-4,6,9,15). Большинство исследователей придерживаются точки зрения о том, что эпителиоидные клетки формируются из макрофагов (3,13,14,15). Однако существуют и другие точки зрения, указывающие на то, что эпителиоидные клетки могут дифференцироваться из моноцитов (5,10,12), минуя фазу дифференцирования в макрофаги, или из отдельной эпителиоидно-клеточной линии, гистогенетически не зависимой от макрофагальной линии клеток (1). В настоящее время на основе результатов гистологических и цитологических исследований по морфологическим критериям выделяют три типа эпителиоидных клеток: плазмоцитоидные (тип А), везикулированные (тип В) и фибробластоподобные (1-4,8,9,15). Однако биологическая сущность эпителиоидных клеток, особенности их происхождения и дифференцировки, а также их роль в патологических процессах еще во многом не ясны. Таким образом, выяснение новых цитоморфологических особенностей эпителиоидных клеток и комплексных критериев их идентификации *in situ* и *in vitro* с учетом различных концептуальных аспектов их происхождения может представлять не только теоретический, но и практический интерес.

Материалы и методы. Эксперименты проводили на мышах, полученных из лаборатории экспериментальных животных Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск): самках линии BALB/c 6-8-нед. возраста, массой 20-22 г. Суспензии перитонеальных клеток получали из перитонеального трансудата мышей и культивировали на покровных стеклах в чашках Петри по описанному ранее методу (1). Гранулы зимозана (Олайнского завода химреактивов) внесли в количестве  $1,5 \times 10^7$  на культуру ( $6 \times 10^6$  клеток). Культуры клеток окрашивали основным

фуксином для исследования методом цветного интерференционного контраста, азур-эозином - для исследования в проходящем и отраженном свете (1). Изображения клеток передавали с объектива микроскопа на объектив видеокамеры Sony TR 330, подключенной к видеоконтрольному устройству ВК 23В60 (Россия), на экран которого (126 x 169 мм) была нанесена сетка, градуированная таким образом, чтобы при максимальном рабочем увеличении на микроскопе цена одного деления составляла 1 мкм. Площади, занимаемые клетками и их ядрами, подсчитывали по формуле:  $S = N \times A + (M \times A)/2$ , где N - количество полных квадратов, совмещенных с изображением, M - количество квадратов, частично совмещенных с изображением, A - площадь квадрата морфометрической сетки. Достоверность различий между сравниваемыми средними величинами оценивали при помощи непараметрического критерия Вилкоксона-Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение. В ряде работ показано, что в культурах тканей и клеток, содержащих макрофаги или моноциты, эпителиоидные клетки выявляются на 1-2-й неделе после начала культивирования (5,12,13,14). Вместе с тем морфологические особенности клеток с эпителиоидным фенотипом и их отличия от клеток макрофагального типа *in vitro* не были четко дифференцированы.

В результате проведенного исследования установлено, что уже на 3-5-е сутки культивирования в культурах перитонеальных клеток интактных мышей, инкубируемых с зимозаном, выявляются крупные эпителиоидные клетки трех типов: везикулированные, плазмоцитоидные и фибробластоподобные. Доминировали плазмоцитоидные клетки (95,5 %). При анализе большого массива эпителиоидных клеток ( $10^5$ ), формирующихся в культуре, обнаружено, что значительная их часть (более 50 %) на 7-е сутки культивирования находятся в клас-терах, состоящих

из 3 и более (до 50) однотипных клеток полигональной формы, плотно прилегающих друг к другу. На 1-е сутки культивирования выявлены относительно небольшие (сравнимые с макрофагами по размерам) клетки плазмочитидного типа (некоторые из них с признаками карิโอкинеза и цитотомии). Эти клетки по целому ряду качественных морфологических особенностей можно отнести к переходным или незрелым

формам клеток-предшественниц эпителиоидных клеток. Условно они были названы "юными" эпителиоидными клетками. В результате сравнительного цитоморфологического анализа эпителиоидных клеток и макрофагов *in vitro* установлено, что по целому ряду количественных и качественных морфологических критериев клетки эпителиоидного типа в значительной степени отличаются от макрофагов (таблицы 1-2).

**Таблица 1.** Результаты морфометрического исследования эпителиоидных клеток и макрофагов в культурах перитонеальных клеток, инкубированных с гранулами зимозана.

Параметры клеток	Тип клеток	
	Эпителиоидные клетки	Макрофаги
Площадь клеток, мкм <sup>2</sup>	2579,2 ± 89,47	875 ± 47,01 **
Диаметр ядер, мкм	20,86 ± 0,31	11,12 ± 0,23 *
Площадь ядер, мкм <sup>2</sup>	309,22 ± 7,43	93,16 ± 4,68 **
Диаметр ядрышек, мкм	3,10 ± 0,06	1,24 ± 0,05 *

Примечание. Анализу подвергалось 500 эпителиоидных клеток и 500 макрофагов (фагоцитировавших гранулы зимозана) на 7-е сутки культивирования. Результаты представлены в виде  $x \pm s$  (%), где  $x$  - средняя арифметическая,  $s$  - стандартная ошибка. Достоверность различий между показателями - \* $p < 0,01$ ; \*\* $p < 0,001$ .

**Таблица 2.** Качественные цитоморфологические особенности макрофагов и клеток эпителиоидного типа, формирующихся в культурах перитонеальных клеток.

Признаки	Макро-фаги	Эпите-лиоидные клетки	"Юные" Эпителиоидные клетки
Форма клеток			
• трапециевидная	±	++	++
• полиморфная	++	-	-
Форма ядер			
• круглая	++	+++	+++
• полиморфная	+	-	±
Распределение базихроматина			
• равномерное	±	++	++
• на периферии ядер	++	±	±
Цвет ядра в проходящем свете			
• бледно-розовый	-	+++	++
• красно-фиолетовый	++	-	-
Цвет ядра в отраженном свете			
• желтый	-	+++	++
• зеленый	+++	-	-
Актиновые пучки			
• в одном направлении	-	++	++
• в разных направлениях	+++	±	-
Краевая зона цитоплазмы			
• ровные края	-	++	++
• неровные края	++	-	-
Филоподии, ламеллоподии	++	±	±

Примечание. Анализу подвергалось 500 эпителиоидных клеток и 500 макрофагов (фагоцитировавших гранулы зимозана) на 7-е сутки культивирования ("юные" эпителиоидные формы оценивали на 2-е сутки). Степень выраженности признаков в популяциях клеток: "-" – признак не выявляется у всех клеток; "±" – встречается у единичных клеток; "+" – менее, чем у 50 % клеток; "++" – более, чем у 50 % клеток; "+++ – у всех клеток. В таблицу включены только наиболее важные для морфологической идентификации клеток варианты оцениваемых качественных признаков.

К одному из ключевых и важных аспектов изучения морфогенеза эпителиоидно-клеточных гранулем, непосредственно связанных с проблемой происхождения эпителиоидных клеток, следует отнести вопрос о механизмах формирования в макрофагальных гранулемах эпителиоидно-клеточных кластеров. Согласно общепринятой концепции происхождения эпителиоидных клеток из макрофагов невозможно заранее предсказать какой макрофаг будет трансформироваться в эпителиоидную клетку. Если исходить из современных представлений о механизмах детерминации полустволовых клеток в различных направлениях клеточной дифференцировки, то процесс индукции клеток-предшественниц какого-либо гистогенетического ряда подчиняется стохастическим законам. Различные колониестимулирующие факторы не определяют направление дифференцировки, а изменяют вероятность того или иного поведения клетки (7,11). Возможно именно эти общие положения о вероятностных механизмах клеточной индукции и детерминации помешали целенаправленному поиску переходных форм от макрофагов к эпителиоидным клеткам не только в экспериментах *in vitro*, но и *in vivo*, поскольку с точки зрения теории вероятности решить указанную задачу не представляется возможным. Тем не менее, нами впервые была предпринята попытка выявить по морфологическим критериям субпопуляцию мононуклеарных клеток, обладающих определенными потенциями к дифференцировке в эпителиоидные клетки.

Были сформулированы две рабочие гипотезы появления в культурах перитонеальных клеток кластеров, состоящих из эпителиоидных клеток. Согласно первому предположению можно было ожидать, что такие высокодифференцированные и высокоспециализированные клетки как макрофаги, с ограниченными потенциями к делению, могут приобретать в процессе трансформации в эпителиоидные клетки способность к активной пролиферации и претерпевать дедифференцировку. Согласно второй гипотезе механизм об-

разования эпителиоидно-клеточных кластеров в культуре клеток мог быть обусловлен существованием своего рода цепной реакции (эффектом "падающего домино"), когда одна зрелая дифференцированная эпителиоидная клетка стимулирует процессы индукции близлежащих макрофагов, включающих механизмы трансформации этих клеток в эпителиоидно-клеточном направлении. Обе эти гипотезы были отвергнуты после первых же экспериментов *in vitro*, поскольку в составе эпителиоидно-клеточных кластеров не было выявлено ни одной клетки, которую можно было бы рассматривать как дедифференцированную или как переходную форму от макрофага к клетке эпителиоидного типа. Более того, было установлено, что в культурах перитонеальных клеток интактных мышей, инкубированных с зимозаном, на 7-е сутки культивирования общее количество единиц эпителиоидно-клеточного формообразования (сумма отдельно отстоящих эпителиоидных клеток и эпителиоидно-клеточных кластеров) достоверно не отличается от количества "юных" эпителиоидных клеток, выявляемых в первые сутки культивирования. Прижизненные (в микрокамерах) наблюдения за процессом формирования эпителиоидно-клеточных кластеров позволили сделать заключение, что прирост клеток в кластерах осуществляется прямым делением ядер эпителиоидных клеток, находящихся преимущественно на периферии кластеров, с последующей цитотомией. Эпителиоидные клетки в составе кластеров приобретали черты типичных эпителиальных клеток, формирующих монослой (по морфологии, расположению и характеру клеточного роста).

Следует подчеркнуть, что ни в одном эксперименте *in vitro* не было выявлено ни одного случая фагоцитоза гранул зимозана эпителиоидными клетками. Напротив, большинство клеток макрофагального типа фагоцитировали гранулы зимозана. Поскольку зимозан вносили в самом начале культивирования, то было очевидно, что клетки-предшественницы эпителиоидных клеток и их переходные формы не обладают фагоцитозной активностью (по крайней мере в отношении гранул зимозана). Вместе с тем было установлено, что в некоторых случаях гранулы зимозана "проникают" в цитоплазму эпителиоидных клеток в результате слияния этих клеток с макрофагами, фагоцитировавшими зимозан, то есть при формировании симпластоподобных клеточных образований.

В результате проведенного исследования можно сделать следующее заключение. Цитоморфологические различия между макрофагами и эпителиоидными клетками, выявленные в

культурах перитонеальных клеток, настолько очевидны и существенны, что с учетом закономерностей формирования *in vitro* клеток с эпителиоидным фенотипом и особенностей морфогенеза эпителиоидно-клеточных кластеров позволяют рассматривать эпителиоидные клетки и макрофаги как гистогенетически и функционально дивергентные клеточные формы.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Архипов С.А. Эпителиоидная клетка. Новая концепция происхождения и дифференцировки. Новосибирск: Наука, 1997. 88 с.
2. Ерохин В.В. Функциональная морфология респираторного отдела легких. М.: Медицина, 1987. 270 с.
3. Струков А.И., Кауфман О.Я. Гранулематозное воспаление и гранулематозные болезни. М.: Медицина, 1989. 184 с.
4. Шкурупий В.А., Курунов Ю.Н., Яковченко Н.Н. и др. // Бюлл. СО РАМН. 2000. № 1. С.62.
5. Arai K., Mizuno K., Yamada T. et al. // *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 1999. V.9. P. 21.
6. Bouley D. M., Ghorri N., Mercer K. L. // *Infection and Immunity.* 2001. V. 69. № 12. P. 7820.
7. Dexter T.M., Spooncer E. // *Annu. Rev. Cell. Biol.* 1987. V. 3. P. 423.
8. Horiuchi Y.; Masuzawa M. // *J. Dermatol.* 1995. V. 22. № 9. P. 643.
9. Koizumi H., Matsumura T., Kumakiri M. et al. // *Nip. Hif. Gakk. Zasshi.* 1990. V.100. № 8. P. 871.
10. Lee J. Y., Atochina O., King B. et al. // *Infection and Immunity.* 2000. V. 68. № 7. P. 4032.
11. Metcalf D. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1980. V. 77. P. 5327.
12. Ohta M., Okabe T., Ozawa K. et al. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1986. V. 465. P. 211.
13. Rhee N.J., Van Burgh C.P., Daems W.T. // *Cell. Tiss. Res.* 1979. V. 197. № 3. P. 355.
14. Seitzer U., Haas H., Gerdes J. // *Histol. Histopathol.* 2001. V.16. №2. P. 645.
15. Turk J.L., Narayanan R.B. // *Immunobiology.* 1982. V.161. №3. P. 274.

#### COMPARATIVE CYTOMORPHOLOGICAL RESEARCH EPITHELIOID CELLS AND MACROPHAGES IN VITRO

Arkhipov S.A.

On the basis of relative cytomorphology analysis of macrophages and epithelioid cells formed in culture, and the data of the scientific literature, the questions concerning problems of a parentage of epithelioid cells and their morphological identification are surveyed.