

© Л. И. Есев, А. В. Павлов, 2014
УДК 611.231.018.7:599.323.4

Л. И. Есев и А. В. Павлов

ЭКСТРУЗИЯ КЛЕТОК ЭПИТЕЛИЯ ТРАХЕИ (ПРИЖИЗНЕННОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. — проф. А. В. Павлов), Ярославская государственная медицинская академия

С помощью комплексной методики прижизненного микроскопического исследования изучена эпителиальная выстилка трахеи 35 белых крыс-самцов линии Вистар в возрасте 3, 6, 12, 18 и 24 мес в сочетании с ее гистологическим исследованием. В ходе анализа видеофайлов двигательной активности цилиарного аппарата был зарегистрирован феномен экстррузии эпителиоцитов из пласта и выделены основные фазы процесса (появление апикальной части элиминируемой клетки над поверхностью эпителия, выход ее ядродержащей части, окончательное выделение клетки из пласта). Экстррузии подвергаются не только гибнущие клетки, но и жизнеспособные элементы, сохраняющие двигательную активность ресничек и неизмененную морфологическую структуру ядер (до 25% от общего числа элиминированных клеток). При изучении гистологических препаратов обнаружены реснитчатые клетки на соответствующих этапах экстррузии. Суммарная доля элиминируемых эпителиоцитов у молодых (3–6 мес) животных составляет 0,4–0,6%, у взрослых и старых (12–24 мес) — 0,9–1,1%.

Ключевые слова: трахея, реснитчатый эпителий, экстррузия клеток, прижизненное исследование

В обеспечении структурной и функциональной целостности эпителиального пласта, наряду с пролиферацией и дифференцировкой клеток, существенную роль играют процессы элиминации эпителиоцитов; сбалансированность этих процессов обеспечивается сложным комплексом внутриклеточных регуляторных механизмов [5, 6]. В последние годы показано, что физиологическая убыль эпителиоцитов реализуется не только через механизмы апоптоза [10], из пласта элиминируются и морфологически жизнеспособные (без инициации гибели) элементы [5, 9]. Последний механизм запускается по достижении критического уровня клеточной плотности эпителиального пласта путем включения сфингозин-1-фосфат- и Rho-киназо-зависимого сокращения акто-миозинового комплекса в базальных частях пласта вокруг элиминируемой клетки и ослабления ее межклеточных контактов с окружающими элементами [7, 8].

Применительно к многорядному реснитчатому эпителию воздухоносных путей показана важная роль апоптоза, как механизма элиминации поврежденных клеток в норме и при развитии патологических процессов (гиперплазия, воспаление) [11]; сведения о возможности элиминации из пласта жизнеспособных эпителиоцитов отсутствуют.

Целью настоящего исследования явились проведение прижизненного анализа феномена экстррузии клеток эпителия трахеи, выделение фаз про-

цесса и последующая регистрации их морфологических эквивалентов на гистологических срезах.

Материал и методы. Изучена трахея 35 белых крыс-самцов линии Вистар в возрасте 3, 6, 12, 18 и 24 мес (по 6–8 животных в возрастной группе). Прижизненную видеофиксацию состояния многорядного реснитчатого эпителия осуществляли при помощи программно-аппаратного комплекса НПО «Азимут» (Россия) согласно детально описанной ранее методике [1]. Выбирали поле зрения, в котором хорошо видна эпителиальная выстилка, изображение воспроизводили на мониторе компьютера в режиме реального времени, записывали на жесткий диск и анализировали на видеофайлах. Гистологическое исследование слизистой оболочки проводили по стандартной методике: после фиксации в смеси Буэна и заливки в парафин гистологические срезы толщиной 3–5 мкм окрашивали гематоксилином – эозином. Частоту встречаемости эпителиоцитов на разных стадиях экстррузии определяли на основании подсчета 1–2 тыс. клеток в эпителиальном пласте у каждого животного. Цифровой материал обрабатывали методами вариационной статистики.

Результаты исследования. В ходе анализа видеофайлов при изучении двигательной активности цилиарного аппарата эпителия трахеи феномен экстррузии эпителиоцитов из пласта был зарегистрирован редко. Основные этапы процесса, наблюдаемые на эпителиальной поверхности, показаны на *рис. 1* (кинограмма). Морфологическая идентификация начала процесса возможна после появления апикальной части элиминируемой клетки над поверхностью эпителия (см. *рис. 1, б*), после чего следуют выход ее ядродержащей части (см. *рис. 1, в, г*) и окончательное выделение клетки из пласта. О жиз-

Сведения об авторах:

Есев Леонид Иванович, Павлов Алексей Владимирович (e-mail: pavlov@yma.ac.ru), кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии, Ярославская государственная медицинская академия, 150000, г. Ярославль, ул. Революционная, 5

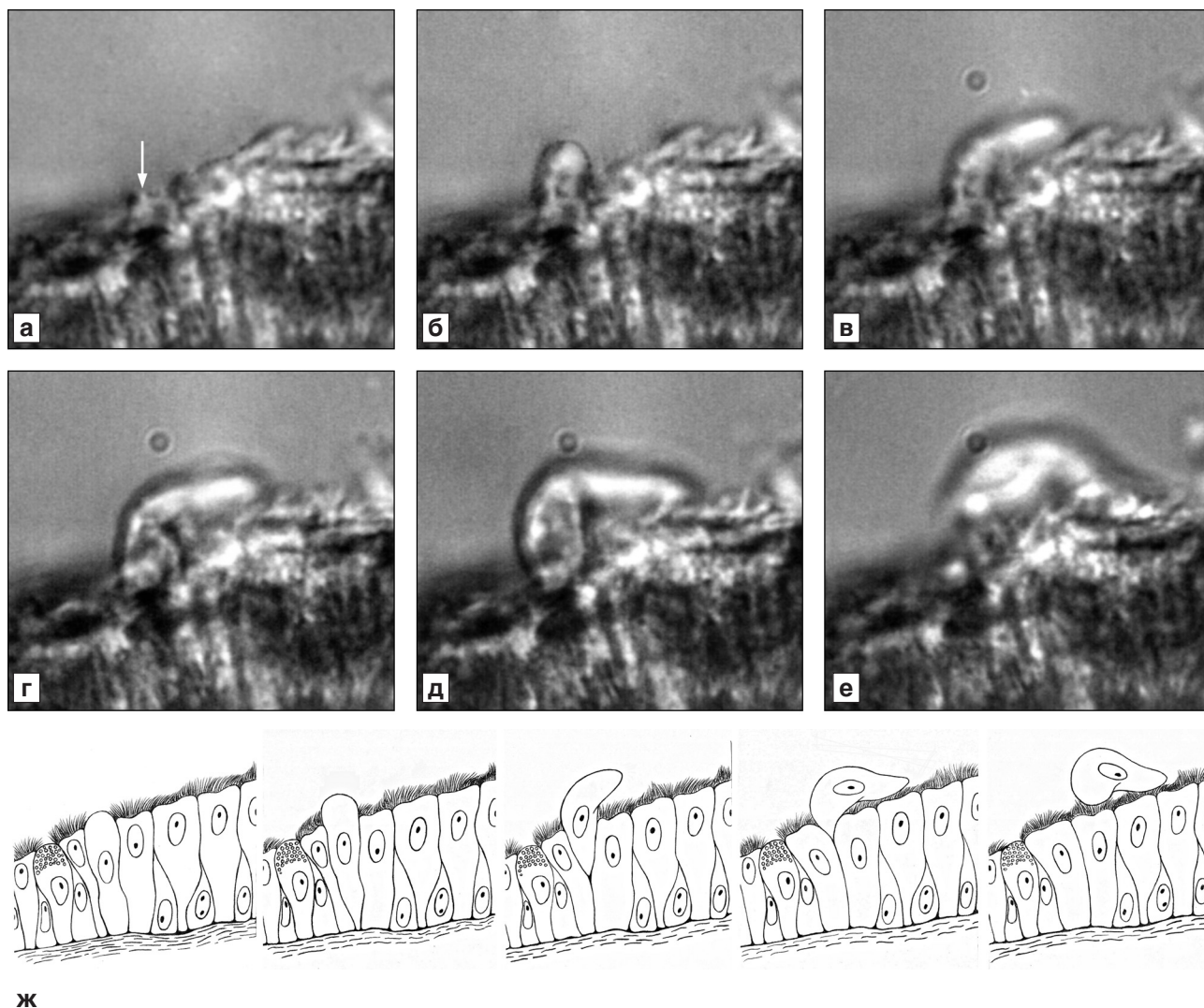


Рис. 1. Последовательные этапы экстррузии эпителиоцита из пласта эпителия трахеи крысы.

а — эпителий в зоне экстррузии клетки (стрелка); б, в — возвышение апикальной части элиминируемой клетки над поверхностью эпителия; г, д — выход ядросодержащей части элиминируемой клетки; е — окончательное выделение клетки из пласта, экструдированная клетка фиксирована на поверхности эпителия; ж — схематическое изображение этапов экстррузии эпителиоцита. а–е — кадры прижизненной микровидеосъемки. Об.90, ок.7

неспособности элиминируемого эпителиоцита свидетельствует морфологически неизменная структура его ядра, сравнимая с таковой в оставшихся клетках пласта. Экструдированная клетка вначале фиксирована на поверхности эпителия (см. рис. 1, е), а затем отрывается и элиминируется движением слизи. Процесс собственно экстррузии — довольно быстрый: от появления апикальной части элиминируемой клетки над эпителиальным пластом до фиксации клетки на его поверхности (см. рис. 1, б–е) проходят 1,5–2 с, в то время как продолжительность нахождения экструдированной клетки на поверхности пласта до момента отрыва колеблется от 8–8,5 с до нескольких минут (максимальное время наблюдения этой фазы составило 10 мин).

При анализе 31 видеофайла, на которых удалось зарегистрировать клеточную экстррузию эпителиоцитов на разных этапах процесса, обнаружено, что в 7 (22,6%) случаях элиминировались элементы без ресничек на апикальной поверхности (предположительно вставочные клетки, см. рис. 1), в 24 (77,4%) наблюдениях из пласта выделялись дифференцированные реснитчатые эпителиоциты (рис. 2). У подавляющего большинства последних (20) двигательная активность ресничек отсутствовала, однако в 4 случаях клетки, фиксированные на поверхности, обладали отчетливо выраженной активностью цилиарного аппарата (частота колебаний их ресничек составила 32,5% от соответствующего показателя у клеток в составе пласта).

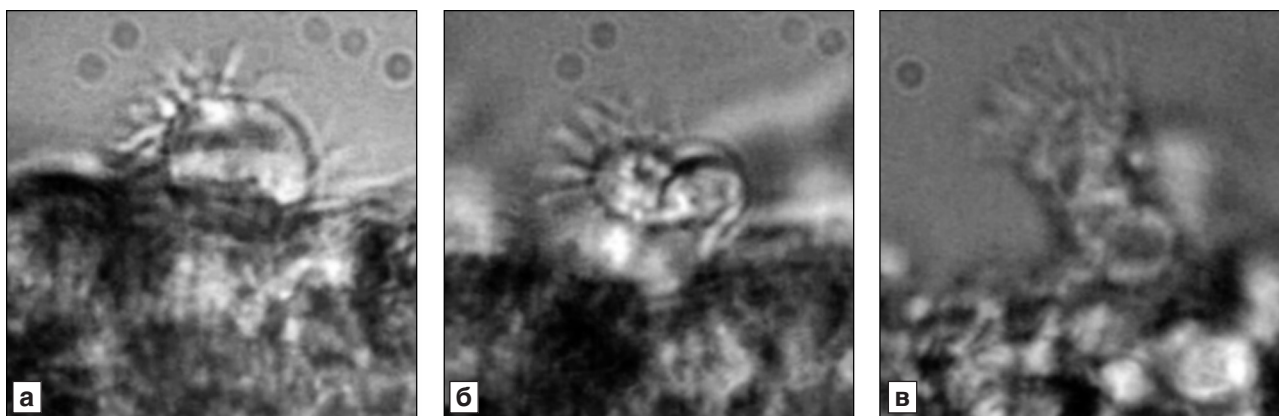


Рис. 2. Экструзия реснитчатых клеток эпителия трахеи у крыс.

а, б — клетки с сохраненной двигательной активностью ресничек; в — эпителиоцит с отсутствующей двигательной активностью ресничек. Кадры прижизненной микровидеосъемки. Об.90, ок.7

Анализ гистологических препаратов трахеи (рис. 3) позволил идентифицировать морфологические эквиваленты фаз процесса экструзии, зарегистрированных при прижизненной видеосъемке. Фазы выхода клетки из пласта (см. рис. 3, а—в) встречались относительно редко, в 90% наблюдений преобладали более поздние фазы процесса (см. рис. 3, г—е). Такое соотношение фаз объясняется существенно большей продолжительностью последних в режиме реального времени. При этом, наряду с клетками с морфологически неизменным ядром (см. рис. 3, а, в, д), из эпителиального пласта элиминируются клетки с фрагментированными (см. рис. 3, б) и пикнотичными (см. рис. 3, г, е) ядрами.

На гистологических препаратах эпителия трахеи обнаружено, что частота встречаемости клеток, находящихся в процессе экструзии, у взрослых и старых крыс (12–24 мес) в 1,9–2 раза выше, чем у молодых (3–6 мес) крыс (таблица). Подавляющее большинство элиминируемых клеток (90 из 115, 78%) имели ядра в состоянии кариопикноза и кариорексиса, однако 22% эпителиоцитов содержали морфологически неизмененные ядра.

Частота встречаемости эпителиоцитов, находящихся на разных этапах экструзии из эпителия трахеи у крыс ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, %)

Возраст животных, мес	Доля экстрадированных клеток
3	0,40±0,03
6	0,63±0,21
12	1,18±0,24*
18	1,04±0,19*
24	0,90±0,11*

* Различия значимы по сравнению с показателями у 3-месячных животных при $P < 0,05$.

Обсуждение полученных данных. В результате прижизненных наблюдений впервые продемонстрирована динамика процесса экструзии эпителиоцитов из пласта *in vivo*, на основании чего определены критерии регистрации эли-

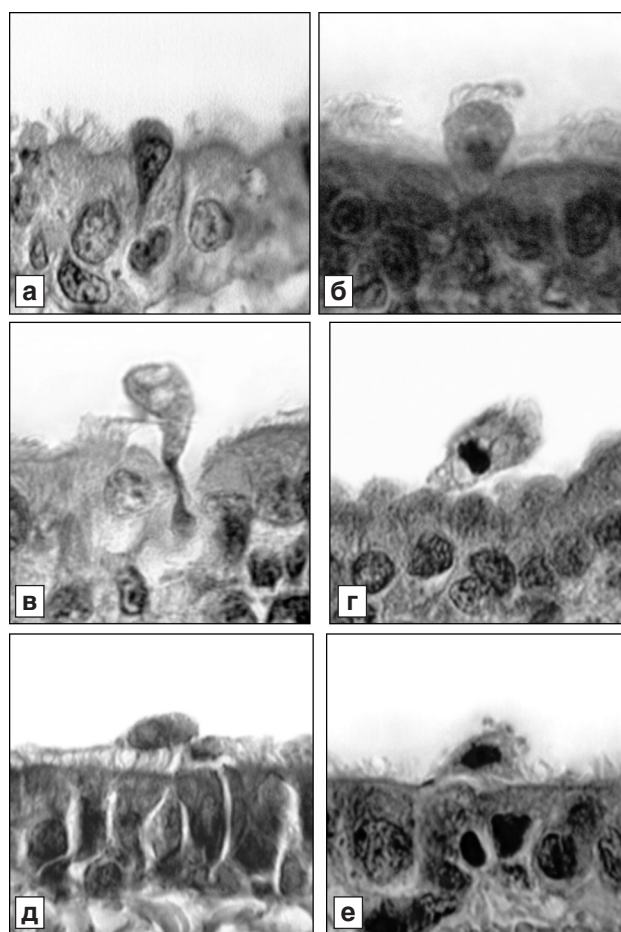


Рис. 3. Этапы экструзии клеток эпителия трахеи у крыс.

а—в — частичный выход эпителиоцита над поверхностью эпителия; г—е — окончательное выделение клетки из эпителиального пласта. Окраска гематоксилином—эозином. Об.90, ок.7

минируемых клеток на гистологических срезах. Показано, что в многоядном реснитчатом эпителии, как и в других разновидностях эпителиальных тканей (однослойный эпителий толстой кишки человека, рецепторный эпителий внутреннего уха у птиц, культура клеток эпителия почки собаки, эпидермальный эпителий зародышей рыб), экстррузии подвергаются не только гибнущие клетки, но и морфологически жизнеспособные элементы [4, 6]; согласно данным прижизненных наблюдений и анализа гистологических срезов, доля жизнеспособных клеток (сохраненная двигательная активность ресничек, морфологически неизменная структура ядра) не превышает 25% от общего числа элиминируемых эпителиоцитов. Суммарная доля клеток на разных стадиях экстррузии, рассчитанная на гистологических препаратах трахеи у взрослых и старых животных (0,9–1,2‰), сопоставима с уровнем митотической активности эпителиоцитов в пласте (0,4–1,1‰ – [3]). Оценка частоты встречаемости эпителиоцитов, находящихся в процессе экстррузии из морфологически и функционально дифференцированного эпителия трахеи, показала, что у взрослых и старых крыс такие клетки обнаруживаются чаще, чем у молодых [2]. Использование разработанных критериев оценки выраженности клеточной экстррузии в комплексе с современным арсеналом изучения клеточной пролиферации позволит провести сбалансированную оценку основных количественных параметров внутритканевого гомеостаза эпителия воздухоносных путей в норме и патологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Павлов А.В. и Есев Л.И. Методические подходы к комплексному изучению функциональной морфологии эпителиальной выстилки трахеи в эксперименте. *Морфология*, 2012, т. 142, вып. 6, с. 73–76.
2. Павлов А.В. и Есев Л.И. Функциональная морфология реснитчатого эпителия трахеи в постнатальном онтогенезе. *Морфология*, 2014, т. 145, вып. 3, с. 149.
3. Романова Л.К. Дыхательная система. В кн.: Структурные основы адаптации и компенсации нарушенных функций. М., Медицина, 1987, с. 263–283.
4. Bird J.E., Daudet N., Warchol M.E. and Gale J.E. Supporting cells eliminate dying sensory hair cells to maintain epithelial

integrity in the avian inner ear. *J. Neurosci.*, 2010, v. 30, № 37, p. 12545–12556.

5. Eisenhoffer G.T., Loftus P.D., Yoshigi M. et al. Crowding induces live cell extrusion to maintain homeostatic cell numbers in epithelia. *Nature*, 2012, v. 484, № 7395, p. 546–549.
6. Eisenhoffer G.T. and Rosenblatt J. Bringing balance by force: live cell extrusion controls epithelial cell numbers. *Trends Cell Biol.*, 2013, v. 23, № 4, p. 185–192.
7. Fernandes-Gonzales R. and Zallen J.A. Felling the Squeeze: Live-Cell Extrusion Limits Cell Density in Epithelia. *Cell*, 2012, v. 149, № 5, p. 965–967.
8. Gu Y., Forostyan T., Sabbadini R. and Rosenblatt J. Epithelial cell extrusion requires the sphingosine-1-phosphate receptor 2 pathway. *J. Cell Biol.*, 2011, v. 193, № 4, p. 667–676.
9. Marinari E., Mechotic A., Curran S. et al. Live-cell delamination counterbalances epithelial growth to limit tissue overcrowding. *Nature*, 2012, v. 484, № 7395, p. 542–545.
10. Rosenblatt J., Raff M.C. and Cramer L.P. An epithelial cell destined for apoptosis signals its neighbors to extrude it by an actin- and myosin-dependent mechanism. *Curr. Biol.*, 2001, v. 11, № 23, p. 1847–1857.
11. Tesfagzi Y. Roles of apoptosis in airway epithelia. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2006, v. 34, № 5, p. 537–547.

Поступила в редакцию 10.06.2014

EXTRUSION OF THE TRACHEAL EPITHELIAL CELLS (IN VIVO STUDY)

L.I. Yesev and A.V. Pavlov

Using a complex technique of intravital microscopic study, the epithelial lining of the trachea of 35 albino male Wistar rats aged 3, 6, 12, 18 and 24 months was examined in combination with its histological study. During the analysis of video files of the ciliary apparatus motor activity, a phenomenon of epithelial cell extrusion from the cell layer was registered and the main phases of this process were described (the appearance of the apical part of the cell being eliminated above the epithelial surface, the release of its nucleated part, the final release of the cell from the layer). It was found that not only the dying cells were extruded, but also the viable elements, preserving the ciliary activity and unchanged morphological structure of nuclei (up to 25% of the total number of eliminated cells). The study of the histological sections demonstrated the ciliated cells at the respective stages of the extrusion process. The total proportion of the epithelial cells being eliminated was 0.4–0.6‰ in young animals (3–6 months old), while in adult and aging rats (12–24 months old) it was equal to 0.9–1.1‰.

Key words: *trachea, ciliated epithelium, cell extrusion, in vivo study*

Department of Histology, Cytology and Embryology, Yaroslavl' State Medical Academy