

ПУШИНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

УЧЕБНЫЙ ЦЕНТР БИОЛОГИИ КЛЕТКИ

на правах рукописи

РОГАЧЕВСКИЙ Вадим Валерьевич

**УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ ПОВТОРНЫХ
ОБРАТИМЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ВО ВКУСОВЫХ РЕЦЕПТОРНЫХ
И ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ГИБЕРНИРУЮЩИХ
СУСЛИКОВ**

(направление 510600-биология)

Магистерская диссертация

Диссертация допущена к защите
Руководитель магистерской программы

проф. д.ф.-м.н. _____ В.А.Печатников

Научный руководитель

д.б.н. _____ В.И.Попов

Пушино 1999

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	стр. 3
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1. вкусовая рецепция	7
1.1.1. вкусовые клетки	7
1.1.1.1. тип-I	9
1.1.1.2. тип-II	9
1.1.1.3. тип-III	10
1.1.1.4. тип-IV (базальные клетки)	10
1.1.2. маргинальные клетки	11
1.1.3. пора и полость вкусовой почки	11
1.1.4. синапсы	12
1.2. организация эпителиев языка и кожи	15
1.3. стволовые клетки	17
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	20
2.1. характеристика экспериментального материала	20
2.2. подготовка экспериментальных животных	21
2.3. подготовка ткани к микроскопии	23
2.4. микроскопия и количественный анализ	24
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	26
3.1. эпителий языка суслика	26
3.2. клетки базального слоя эпителиев кожи и языка	28
3.3. клетки стволовые	34
3.4. причины остановки клеток в “метафазах”	35
3.5. эффекты гипотермии в дифференцированных клетках	40
3.6. стволовые клетки вкусовых почек	50
3.7. морфо-функциональная пластичность вкусовых почек	51
ВЫВОДЫ	68
ЦИТИРУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА	69

ВВЕДЕНИЕ

Вкусовой анализатор представляет одну из разновидностей хемосенсорных систем организмов. По сравнению со зрительным, обонятельными и слуховым анализаторами, и несмотря на увеличивающееся количество работ по вкусовой рецепции, слабо изучены механизмы функционирования его периферического отдела – вкусовой почки - изучены слабо. Такие вопросы, как происхождение типов вкусовых клеток и их классификация все еще не решены. Почти ничего не известно о прямых предшественниках вкусовых клеток и путях их дифференцировки. Практически отсутствуют данные о пролиферативной активности клеток вкусовой почки и ее эпителиального окружения.

Ключевым вопросом современной биологии, включая клеточную и молекулярную биологию, биологию развития, эмбриологию, онкологию, является изучение как генетических, так и физико-химических факторов, обеспечивающих дифференцировку различных типов клеток в пролиферирующих тканях позвоночных. Уже давно кератиноциты различных типов эпителиев стали классическим объектом в исследованиях влияния физико-химических воздействий, включая ростовые факторы, на различные этапы терминальной клеточной дифференцировки. Действительно, в слоистой структуре поверхностных эпителиев прямо отражены последовательные стадии дифференцировки кератиноцита, начиная с базальных стволовых клеток и кончая корнеоцитами рогового слоя. В этом же плане не меньший интерес представляют вкусовые клетки, которые, как известно, имеют относительно короткую продолжительность жизни - около 10 дней [Farbman, 1980].

Вопросы дифференцировки как эпителиальных, так и вкусовых клеток тесно связаны с не менее фундаментальной проблемой, как выявление, распределение и поведение стволовых клеток в пролиферирующих тканях. Так в постоянно пролиферирующем обонятельном нейроэпителии только недавно с использованием молекулярно-генетических методов было показано, что все

клетки базального слоя являются предшественниками обонятельных рецепторных клеток, продолжительность жизни которых не превышает обычно 2 недель [Caggiano et al. 1994].

Существенно, что в ряде случаев, таких, например, как гибернация, продолжительность жизни различных клеток увеличивается при охлаждении организма животного. Одновременно с этим гибернация животных позволяет получить практически полный набор всех функциональных состояний клетки: от активного в состоянии нормотермии до практически полного прекращения метаболизма клетки, когда температура тела животного падает до 0°C. В этой связи зимняя спячка якутского длиннохвостого суслика представляет уникальную физиологическую модель для изучения различных процессов как на организменном и тканевом, так и на клеточном и субклеточном уровнях. Поэтому исследование зимней спячки животных позволяет совершенно по-новому подойти к изучению процессов пролиферации и дифференцировки вкусовых клеток и окружающих их клеток эпителия.

Крайне важно отметить, что в отличие от многих других зимоспящих животных спячка длиннохвостого суслика *Citellus undulatus* представляет циклический процесс, заключающийся в обратимом и повторном входе суслика в состояние холодового оцепенения в течение всего периода зимней спячки. Промежуток времени между двумя нормотермными состояниями, называемый баутом гибернации (*bout*-приступ; мед.) обычно составляет в условиях вивария 1-2 недели, тогда как длительность нормотермных промежутков находится в пределах 1-2 дней. Следовательно, в процессе зимней спячки практически все типы клеток животных имеют обратимые и повторные структурно-функциональные изменения. Большим достоинством модели зимней спячки является возможность простого температурного мониторинга за функциональным состоянием практически любого органа и ткани.

Задачей настоящей работы стало исследование обратимых и повторных изменений структурно-функциональной организации вкусовых клеток всех трех типов вкусовых сосочков, а также эпителия языка и для сравнения эпидермиса

кожи у сусликов в различных функциональных состояниях: летней активности, спячки и состояний спровоцированного пробуждения, а также нормотермию между баутами гибернации. Для оценки функционального состояния вкусовых клеток нами был использован морфометрический анализ белок-синтезирующего аппарата, а именно, оценка соотношения свободных и мембран-связанных рибосом, моносом и ультраструктура ядрышка во вкусовых клетках типа-III. С целью определения температуро-зависимых изменений во вкусовых клетках типа-III и для проверки полученных эффектов нами впервые были проведены ультраструктурные исследования аналогичных параметров в пирамидных нейронах гиппокампа с использованием искусственного охлаждения тела крыс и мышей ниже 20°С. Одновременно с этими исследованиями нам удалось найти новый подход к определению и исследованию стволовых клеток в эпителиях и в раковых опухолях.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Ключевым вопросом современной биологии является изучение как генетических, так и физико-химических факторов, обеспечивающих дифференцировку различных типов клеток в пролиферирующих тканях позвоночных.

Для этих целей уже давно кератиноциты различных типов эпителиев стали классическим объектом в исследованиях влияния физико-химических факторов, включая ростовые факторы, на различные этапы их терминальной дифференцировки.

Не меньший интерес представляют вкусовые клетки, которые, как известно, имеют относительно короткую продолжительность жизни (около 10 дней [Farbman, 1980]). Но о прямых предшественниках вкусовых клеток и путях их дифференцировки почти ничего не известно. Практически отсутствуют данные о пролиферативной активности клеток вкусовой почки и ее эпителиального окружения.

В таких случаях, как гибернация, уровень метаболизма, продолжительность митотического цикла, скорость дифференцировки и время жизни различных клеток существенно изменяется при охлаждении организма животного. Крайне важно отметить, что условия среды обитания зимоспящих сформировали механизмы сохранения энергии, основанные на регуляции метаболизма целого организма, а точками приложения авторегуляторных воздействий являются отдельные клетки. Следовательно, в процессе зимней спячки практически всем типам клеток животных приходится претерпевать обратимые и повторные структурно-функциональные изменения.

У негиберирующих животных циклические изменения непрерывно происходят в стволовых клетках быстро обновляющихся тканей. Но по модуляциям пролиферативной активности тканей зимоспящих в связи со сложностью многоуровневой системы её регуляции почти ничего не известно

[Wang, 1982], также отсутствуют данные по межбаутной пролиферативной активности тканей зимоспящих.

1.1. вкусовая рецепция

Вкусовая рецепция играет важную роль в жизни как примитивных организмов, так и находящихся на высших ступенях эволюционного развития. По своей сути вкусовая рецепция представляет типичную периферическую хемосенсорную систему, которая способна различать и распознавать различные химические молекулы, начиная от кислот, щелочей и их солей, кончая сложными наборами высокомолекулярных соединений биологического происхождения.

1.1.1. вкусовые клетки

В настоящее время известно, что у млекопитающих вкусовые рецепторные клетки образуют вкусовые почки, которые располагаются в трех типах вкусовых сосочков: грибовидные (fungiform papilla), листовидные (foliate papilla) и желобоватые (circumvallate or vallate papilla). Основным структурным элементом всех типов сосочков является вкусовая почка, которая согласно данным многих авторов образована приблизительно 50 вкусовыми клетками. Принципиальной особенностью вкусовых почек является то, что все они располагаются в неороговевающем эпителии, главным образом, дорзальной части языка. Находящиеся на поверхности языка различные соединения контактируют с вкусовыми рецепторными клетками через поры, которые имеют диаметр до 10 μm и образованы поверхностными эпителиальными роговыми чешуйками (корнеоцитами), замыкающими апикальный отдел вкусовой почки [Douglass, 1987].

Важной особенностью всех вкусовых клеток в почках всех типов является то, что их базальная часть контактирует с базальной пластинкой, тогда как апикальные концы выходят во вкусовую пору. В конечном итоге, каждая почка всех типов сосочков млекопитающих подобна апельсину, в котором вкусовые клетки располагаются в виде его долек.

Если многочисленные грибовидные сосочки (200 и более) располагаются преимущественно на кончике и в передних двух третях языка, то два листовидных сосочка располагаются на задних боковых поверхностях языка. Грибовидные сосочки в большинстве случаев содержат одну и гораздо реже две и более почки. Листовидные сосочки похожи на «жабры акулы». Поверхность эпителия таких углублений содержит многочисленные почки, число которых варьирует у разных животных. Желобоватые сосочки располагаются на задней дорзальной поверхности языка, в области перехода ротовой полости в глотку. Число этих сосочков различно в зависимости от вида животного. Например, у мышей, крыс и хомячков один желобоватый сосочек, у сусликов три, тогда как у человека от 8 до 12.

Поверхность вкусовых почек омывается секретом, выделяемым Эбнеровскими железами, который участвует в передаче вкусовых стимулов к клеткам вкусовой почки.

Как это было отмечено выше, контакт вкусовых стимулов с вкусовыми клетками осуществляется через пору в окружающем эпителии. Важно отметить, что под порой находится некоторое пространство (внутренняя камера вкусовой почки), которое заполнено микроворсинками вкусовых клеток. Микроворсинки заполнены многочисленными актиновыми микрофиламентами, которые обеспечивают их высокую подвижность и, следовательно, перемешивание в поровом пространстве как секретируемых этими клетками соединений, так и поступающих через пору вкусовых стимулов.

Первый ультраструктурный анализ вкусовых почек у млекопитающих был сделан Engstrom и Rytzner [Engstrom, Rytzner, 1956] на кролике. Эти авторы все клетки во вкусовой почке определили как «вкусовые клетки»; тогда как Trujillo-Cenos [Trujillo-Cenos, 1957] назвали их «нейроэпителиальными клетками». Nemetschek-Gansler и Ferner [Nemetschek-Gansler, Ferner, 1964] уже стали различать во вкусовой почке «плотные клетки», «вакуолизованные клетки» и «припочечные (перигемальные) клетки». Однако только с работ Мюррея начались систематические ультраструктурные исследования вкусовых клеток

[Murray R. G. and Murray A. 1960, 1970, 1971; Murray et al., 1969; Murray, 1978, 1986.]. Номенклатура, предложенная в работах Мюррея, до сих пор используется в современной литературе. Он ввел следующую далее классификацию вкусовых клеток.

1.1.1.1. *mun-I*

Эти клетки интенсивно окрашиваются на ультратонких срезах и поэтому их еще называют темными клетками. Эти клетки имеют удлиненную форму и располагаются во всех частях вкусовой почки. Во вкусовой почке их количество составляет от 55 до 75% от всех клеток [Lindemann, 1996]. Характерной особенностью этих клеток является присутствие в апикальном отростке так называемых «электронно-плотных гранул» (*dense granules*), диаметр которых варьирует от 100 до 400 нм. Темные клетки образуют тонкие выросты цитоплазмы в виде «крыльев», которыми они охватывают вкусовые клетки типов II и III. В литературе часто можно встретить другое их название «wing cells» или «крылатые клетки» [Lindemann, 1996]. В цитоплазме клеток типа I выявляются пучки промежуточных филаментов; гладкий и шероховатый ретикулум; аппарат Гольджи и лизосомы. Поверхность ядра неровная и имеет многочисленные инвагинации ядерной оболочки. Предполагается, что тип I вкусовых клеток выполняет следующие функции:

1. Секреция в полость вкусовой почки содержимого "плотных гранул";
2. Подобно Шванновским клеткам они «обхватывают» вкусовые клетки типов II и III и нервные окончания своими “крыловидными” отростками, обеспечивая, таким образом, изоляцию. Предполагается, что одновременно с «изоляцией» светлых клеток темные клетки несут и трофическую функцию;
3. Фагоцитарная функция темных клеток во вкусовой почке.

1.1.1.2. *mun-II*

Так как интенсивность окрашивания этих клеток на ультратонких срезах низкая, то эти клетки относят к светлым клеткам и поэтому их еще называют

светлые клетки типа II. Обычно число этих клеток в почке варьирует от 15 до 30 %. Подобно темным клеткам, эти клетки содержат микроворсинки на апикальных концах отростков. Обычно цитоплазма содержит многочисленные и часто набухшие цистерны гладкого эндоплазматического ретикулума, цистерны шероховатого ретикулума; свободные полисомы и редкие промежуточные филаменты. Относительно крупные митохондрии, как правило, встречаются в окооядерной области, где также локализуются диктиосомы аппарата Гольджи; лизосомы и мультивезикулярные тельца подобные липофусцину.

Предполагается, что эти клетки иннервируются как афферентно, так и эфферентно.

1.1.1.3. *тип-III*

По своим свойствам окрашивания эти клетки очень близки к светлым клеткам типа II. В отличие от клеток типа II эти клетки имеют две характерные особенности:

1. в цитоплазме клеток выявляются «везикулы с плотной сердцевиной» (dense-core vesicles) диаметром от 80 до 140 нм;
2. в цитоплазме видны пучки промежуточных филаментов.

Во вкусовых почках их число обычно составляет 5-15 % [Lindemann В. 1996]. Эти клетки содержат цистерны как шероховатого, так и гладкого ретикулума, их ядра больше и окрашиваются более интенсивно, чем в клетках типа II. Предполагается, что именно в этих клетках осуществляется трансдукция вкусовых сигналов на нервные окончания, с которыми они образуют типичные синапсы.

1.1.1.4. *тип-IV (базальные клетки)*

Так как эти клетки не образуют отростков, которые бы достигали вкусовой поры, то во многих статьях, где используют классификацию вкусовых клеток на типы I, II и III упоминания о типе IV клеток отсутствуют. Тем не менее, 1-2 базальные клетки встречаются во всех вкусовых почках [Reutter, Witt,

1993]. Однако их точное число во вкусовой почке неизвестно. Они лежат непосредственно на базальной пластинке. Эти клетки, главным образом, округлые. На срезах их цитоплазма относительно интенсивно окрашивается по сравнению со светлыми клетками обоих типов. В цитоплазме выявляются митохондрии; цистерны шероховатого ретикулума; рибосомы и промежуточные филаменты. Базальные клетки не содержат «плотных» гранул и «везикул с плотной сердцевиной». В редких случаях некоторые авторы наблюдали митотически делящиеся базальные клетки.

1.1.2. маргинальные (пограничные или краевые) клетки

Пограничные клетки представляют неспециализированные эпителиальные клетки, которые располагаются исключительно по периферии вкусовых почек. Эти клетки содержат пучки промежуточных филаментов; между собой образуют «пальцевидные» контакты с доминирующим типом межклеточных соединений, таким как десмосома. Имеются единичные работы [Beidler, Smallman, 1965, Farbman A. I. 1980], в которых предполагается, что маргинальные клетки мигрируют в центр вкусовой почки, где они трансформируются в клетки типа I и типа III, а, возможно, и в базальные клетки.

1.1.3. пора и полость вкусовой почки

Считается, что микроворсинки на апикальных отростках клеток типа I и типа III непосредственно не контактируют через вкусовую пору с эпителиальной поверхностью языка, а располагаются в полости вкусовой почки.

Полость вкусовой почки заполнена интенсивно окрашиваемой на срезах вкусовой слизью, которая имеет высокую электронную плотность. Использование гистохимических методов выявило в полости гликопротеиды [Brouwer, Wiersma, 1978; Reutter, Klessen, 1979; Scalzi, 1967]. На электронно-микроскопическом уровне при использовании лектинов было показано [Ohmura, et al. 1989], что вещество слизи, заполняющей вкусовую полость, происходит из содержимого «плотных» гранул клеток типа I. Также показано [Farbman, et al.

1987], что секрет «плотных» гранул из клеток типа I связывает синтетический сладкий по вкусу белок - тауматин. Однако имеет ли отношение это связывание к вкусовой функции все еще не ясно. Используя лектины, было показано [Witt, Reutter, 1988], что слизь содержит такие сахара как N-ацетил-галактозоамин, фукозу, маннозу и N-ацетил-глюкозоамин.

Предполагается [Toyoshima, Tandler, 1987], что клетки типа III также секретируют во вкусовую полость различные соединения.

Функция вкусовой слизи внутри вкусовой полости все еще остается неясной. Имеются гипотезы о том, что она связана с сортировкой и доставкой к вкусовым рецепторам вкусовых стимулов [Bannister, 1974]. Предполагается, что слизь внутри вкусовой почки функционально связана с секретами слюнных и Эбнеровских желез.

1.1. синапсы

Считается, что во вкусовых почках присутствуют как афферентные, так и эфферентные нервные волокна, образующие с вкусовыми клетками синапсы. Однако вопрос о том, какие типы клеток образуют синапсы, также как и их выявление в различных вкусовых сосочках у различных животных все еще остается открытым.

Используя высоковольтную просвечивающую электронную микроскопию и серийные срезы, Kinnamon и Delay [Kinnamon et al., 1985, 1988; Delay et al. 1986] исследовали вкусовые клетки желобоватых сосочков мыши. Эти авторы обнаружили, что в этих сосочках вкусовые почки состоят из темных, промежуточных и светлых клеток. Согласно их данным все эти клетки образовывали "типичные" синаптические контакты: пресинаптическая часть синапсов была представлена цитоплазмой вкусовых клеток и в области контакта содержала пресинаптические везикулы, тогда как постсинаптическая часть представляла окончание или расширение (varicosity) нервного волокна, где можно было видеть постсинаптическое утолщение (postsynaptic density), образованное филаментозным материалом. Эти же авторы [Delay et al. 1986;

Kinnamon et al., 1985, 1988] обнаружили два типа синаптических связей: «пятно-подобные» (macula) [Arvidson et al. 1981a, 1981b] и «пальцеподобные» или «пальцевидные» (finger-like). Кроме того, они показали, что клетки типа I и клетки типа II никогда не образовывали синаптических связей с одним и тем же нервным волокном.

С другой стороны, в отличие от клеток желобоватых сосочков языка мыши во вкусовых клетках листовидных сосочков кролика синаптические связи практически другие. Согласно Мюррею (1986), клетки типов II и III афферентно иннервированы нервными волокнами, и только они являются хемосенсорными вкусовыми клетками у кролика. Только клетки типа III были способны образовывать до 6 синапсов с нервными волокнами.

Одной из характерных особенностей вкусовых клеток типа III является наличие в них везикул или пузырьков с «плотной сердцевинкой» (dense core vesicles). В настоящее время на основании гистохимических данных [Nada, Hirata, 1975; Takeda, Kitao, 1980] считается, что эти везикулы содержат серотонин. Однако роль серотонина как возможного нейротрансмиттера во вкусовой рецепции остается все еще не ясной. Совсем недавно появились сведения о возможном участии АТФ в качестве нейромедиатора во вкусовых клетках [Bo et al., 1999].

Кроме того, в нервных волокнах вкусовых почек обнаружены различные нейропептиды [Finger, 1985]. Так, во вкусовых почках крысы присутствует синапсин-1, который локализован только в окончаниях нервных волокон, тогда как сами вкусовые клетки не дают реакцию на синапсин-1 из-за отсутствия у них аксонов [Finger et al. 1990]. Во вкусовых клетках морской свинки в нервных волокнах обнаружен S-100, SP-35 и другие нейрональные белки ЦНС [Yoshie, 1988].

Несмотря на вышеизложенные сведения, вопросы как о происхождении и классификации вкусовых клеток, так и их роли во вкусовой рецепции все еще остаются открытыми.

Принципиальным моментом является то, что в обычных условиях у

нормотермных животных вкусовые клетки постоянно находятся на различных стадиях терминальной дифференцировки. И как уже отмечалось выше, считается, что продолжительность жизни вкусовой клетки не превышает 2 недель [Beidler, Smallman, 1965; Lindemann, 1996; Bradley, 1971; Murray, 1971].

Результаты, полученные Dr. J. Kinnamon (Denver University, USA) на желобоватых сосочках мыши, показали присутствие синапсов между нервными окончаниями, приходящими во вкусовые почки, и всеми тремя типами вкусовых клеток. Это позволило ему предположить, что каждый из трех типов вкусовых клеток отражает определенный этап их последовательной дифференцировки.

Тёмные клетки тип-I значительно отличаются от светлых клеток не только по ультраструктуре, но и по их функциям в почке. В частности, отличительной особенностью темных клеток является их способность подобно Шванновским клеткам изолировать друг от друга светлых клеток обоих типов, включая нервные окончания. Ранее эти результаты были подробно отражены в магистерской работе Л.В. Барыниковой (1998). То, что эти клетки не образуют миелинизированных волокон, не является чем-то уникальным. Подобные Шванновские клетки широко распространены в обонятельном нейроэпителии, где они собирают аксоны первичных обонятельных рецепторных нейронов, образуя немиелинизированные нервные волокна, идущие к обонятельной луковице [Попов и др., 1990]. Таким образом, имеются достаточные основания считать темные клетки типа-I по происхождению астроглиальными клетками, выполняющими во вкусовой почке функцию Шванновских клеток. Следовательно, если три типа вкусовых клеток реально существуют, то они должны иметь своих трех предшественников среди базальных стволовых клеток во вкусовой почке. Имеющиеся же в литературе данные [Reutter and Witt, 1993] свидетельствуют о том, что во вкусовых почках у разных животных может быть более одной базальной клетки. Поэтому любая возможность надежного определения числа митотически активных базальных клеток во вкусовой почке явилось бы важной информацией для выявления числа клеточных линий вкусовых клеток.

1.2. организация эпителиев языка и кожи

Вкусовые почки располагаются в неороговевающем эпителии языка. Продолжительность жизни отдельного кератиноцита крайне коротка и составляет, как и у вкусовых клеток, около 10 дней. В послойной организации эпителия языка отражены последовательные этапы дифференцировки кератиноцита: базальный слой содержит многочисленные постоянно делящиеся клетки, которые прикреплены к базальной пластинке. Базальная пластинка обеспечивает надежный контакт эпителия с дермой, представляющей коллаген-глюкозаминогликановый каркас, который пронизан многочисленными кровеносными сосудами и нервными окончаниями. По мере деления кератиноциты передвигаются в следующий – шиповатый слой, который образован 2-3 рядами клеток. В этом слое кератиноциты образуют выросты цитоплазмы в виде шипиков и между шипиками соседних клеток располагаются разуются десмосомальные контакты, обеспечивающие высокую механическую прочность всех видов эпителиев. Одновременно с образованием десмосом между клетками формируются щелевые контакты (gap junctions), которые обеспечивают обмен между клетками метаболитами с молекулярным весом до 1000 Да. Шиповатый слой переходит в зернистый слой, названный так потому, что в нем выявляются многочисленные кератогеалиновые гранулы, состоящие из белка филагрина. Кроме того, в кератиноцитах зернистого слоя под плазматической мембраной формируется белковая инволюкриновая оболочка. До ее формирования кератиноциты в норме активно секретируют так называемые тельца Одланда (кератиносомы или ламеллярные гранулы). Эти гранулы содержат липиды, которые после формирования инволюкриновой оболочки и разрушения плазматической мембраны выступают в качестве своеобразного «клея». Они играют особую роль в эпидермисе кожи, регулируя ее проницаемость. Зернистый слой переходит в роговой, особенностью которого является терминальная дифференцировка кератиноцита в корнеоцит или роговую чешуйку. Смысл терминальной дифференцировки кератиноцита заключается в том, что на окончательном этапе все содержимое клетки

заполняется белком кератином, тогда как другие органеллы, например, ядро, митохондрии и др. полностью деградируют. В норме между эпителиями языка и кожи существуют принципиальные различия: если в эпидермисе кожи окончательным (терминальным) этапом дифференцировки является образование роговой чешуйки, заполненной фибриллярным белком кератином, то в так называемом неороговевающем эпителии языка в кератиноцитах верхнего слоя могут присутствовать остатки клеточных органелл. Для эпидермиса кожи такая ситуация характерна при различных патологиях (например, у человека в случае псориаза, а также при ряде других кожных заболеваний – паракератозах и даже в норме при заживлении ран). В случае эпителия языка тельца Одланда не были обнаружены.

В отличие от эпителия языка эпителий кожи содержит так называемые эпидермальные придатки, а именно: волосяные фолликулы, потовые и сальные железы. По своей сути волос представляет многоклеточное образование, где имеет место терминальная дифференцировка кератиноцитов. Потовые и сальные железы относят к так называемым эпидермальным придаткам в силу того, что они тесно связаны с эпидермисом, например как эпидермис, так и эпидермальные придатки имеют единый непрерывный базальный слой. Хотя и считается, что в случае ран и ожогов неповрежденные сальные и потовые железы могут давать начало кератиноцитам самого эпидермиса, тем не менее, нет данных о том, что они могут восстанавливаться после глубоких ожогов и ран. [Термин глубокие ожоги и раны нами используется в случае, когда весь слой кожи до подкожной клетчатки, так или иначе, отсутствует.] В этих же случаях не могут формироваться и волосяные фолликулы. Данный дефект наиболее характерен для человека, у которого контракция (сокращение) ран слабо выражена.

1.3. стволовые клетки

Важной особенностью эпителиев является присутствие в базальном слое стволовых клеток, гибель которых в конечном итоге идет по апоптотическому пути. В отличие от эпителия языка эпидермис кожи животных является классическим примером исследования терминальной дифференцировки. Во многом это связано с тем, что анализ терминальной дифференцировки кератиноцитов эпителия языка затруднен, как по причине сложности рельефа базального слоя, так и из-за присутствия вкусовых сосочков и почек.

В начале 70-х годов MacKenzie (1969) и Potten (1974) для эпидермиса кожи мышей ввели термин «пролиферативная единица». Это было связано с тем, что в коже мышей корнеоциты можно было видеть в виде колонок. Авторы считали, что в основании таких колонок лежат стволовые или бластные клетки. Хотя стволовые клетки являются предметом интенсивных исследований, как из-за их уникальных биологических свойств, так и из-за их потенциально большой медицинской важности, тем не менее, понятие «стволовая клетка» трактуется достаточно широко [см., например, Hall, Watt, 1989; Potten, Loeffler, 1990]. Так, в одном из недавних обзоров, опубликованных в журнале *Cell* [Morrison et al. 1997], понятие стволовой клетки сравнивается с понятием порнографии, которое дал председатель Верховного суда США Байрон Вайт (Byron White): «Это понятие очень тяжело определить, но я знаю это, когда я это вижу». По крайней мере, в понятие стволовой клетки должны входить ее свойства: как способность к самовоспроизведению, так и ее способность образовывать определенную линию клеток в течение всей жизни животного. К сожалению, этого определения явно не достаточно, так как после деления стволовой клетки образуются две дочерние клетки, судьбу которых в настоящее время практически не представляется возможным проследить. Не решен также вопрос: обе ли клетки продолжают дальше делиться, или одна из них немедленно начинает дифференцироваться.

В экспериментах *in vivo* и *in vitro* было продемонстрировано существование стволовых клеток в кишке [Potten, Loeffler, 1990], гонадах [Dym,

1994], коже [Lavker et al., 1993] и в обонятельном нейроэпителии [Caggiani et al., 1994; Monti Graziadei and Graziadei, 1979]. Однако, в этих исследованиях присутствие стволовых клеток было показано не прямо, а следовало из определенных предпосылок. Не вызывает сомнения факт необходимости в стволовых клетках в печени [Sigal, 1992], поскольку клетки печени быстро регенерируют в ответ на повреждение, но до сих пор прямого присутствия стволовых клеток в печени не обнаружено, и с позиций даже современных знаний очень трудно понять, каким образом после повреждения может происходить деление уже дифференцированных гепатоцитов [Wilson, 1996]. Таким образом, стволовые клетки таят еще много загадок. В этой связи рассмотрим некоторые свойства стволовых клеток.

Считается, что стволовые клетки кроветворной системы, нервной системы, гонад, печени и тонкого кишечника образуются *de novo* в течение эмбриональной жизни [Morrison et al., 1997]. Предшественников стволовых клеток называют пре-стволовые клетки. Считается, что стволовые клетки образуются в течение строго определённой стадии эмбрионального развития. Практически ничего не известно о событиях, которые регулируют процесс образования компетентных стволовых клеток у эмбрионов. Имеются определенные доказательства того, что в одной и той же ткани могут одновременно существовать различные классы стволовых клеток. Предполагают, что эмбриональные гемопоэтические стволовые клетки печени дают начало костномозговым стволовым клеткам взрослого животного [Fleischman, 1982].

Кроме таких основных свойств стволовой клетки как регуляция собственного размножения и последующая дифференцировка, важным их свойством является также способность к асимметричному клеточному делению [Hall and Watt, 1989; Loeffler and Potten, 1990], когда одна из дочерних клеток сохраняет свойства стволовой клетки, тогда как другая клетка подвергается дифференцировке. Асимметричное клеточное деление было показано у медицинской пиявки (*Hirudo medicinalis*), дрозофилы (*Drosophila melanogaster*) и для нематоды (*Caenorhabditis elegans*), тогда как у млекопитающих считается,

что клеточное деление идет симметрично [Morrison et al., 1997]. Например, у дрозофилы асимметричные клеточные деления стволовых клеток зависят как от ассимметричного распределения некоторых белков, так и от ориентации митотического веретена [Doe, Spana, 1995]. Существование популяций стволовых клеток в течение жизни взрослого животного зависит как от выживаемости покоящихся клеток, так и от их способности к циклическому самовосстановлению. Так, покоящиеся стволовые клетки показаны для печени [см. обзор Grisham and Coleman, 1996], мозга [Morshead et al., 1994] и костного мозга [Morrison, Weissman, 1994]. Однако, до сих пор не ясно, находятся ли эти клетки действительно в стадии покоя (G_0), или они медленно проходят стадию клеточного цикла G_1 .

В последнее время появляется всё больше исследований в области архитектуры тканей [Geusebroek et al., 1999]. В этих работах отмечается, что даже в раковых опухолях распределение клеток не случайно и клетки сохраняют чёткую архитектуру, позволяющую топологически выявить отдельную линию клеток, которая сохраняет наибольшую способность к пролиферации. Более выгодное положение занимают вкусовые почки. В отличие от эпителия или опухолей, они имеют ограниченное число клеток, и тем более, клеток стволовых, которые локализованы в базальной части вкусовой почки. Как указывалось выше, далеко не все клетки находятся в состоянии пролиферативной активности. В связи с этим возникает вопрос: как отличить стволовую клетку от клетки вступившей на путь дифференцировки? Обнаруженные нами феномены, связанные с естественной гибернацией и искусственной гипотермией животных [Рогачевский и др. 1998], позволяют визуализировать стволовые клетки, используя природные механизмы их накопления в метафазе.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. характеристика экспериментального материала

Данная работа проведена на более чем 50 взрослых длиннохвостых сусликах *Citellus undulatus*, на 10 крысах Wistar и на 30 беспородных мышах. Суслики обоих полов, весом 400-900г, отловленные в Якутии содержались в условиях вивария в индивидуальных клетках с естественной фотопериодикой. Крысы (150-250г) и мыши (18-30г) были выращены в условиях вивария ИБК РАН. Кроме того, в работе использованы материалы из органов и тканей домашней кошки и морской свинки.

Согласно поставленным задачам, в данной работе мы сравнивали физиологические состояния сусликов:

- а) “активное” летнее животное (июль-август; с температурой мозга (T_M) 36-38°C и частотой сокращений сердца (ЧСС)--150-300 уд./мин.);
- б) 360-дневное гибернирующее животное (в середине баута гибернации; T_M 2-5°C. и ЧСС--6-8 уд./мин.);
- с) “квазиактивное” зимнее животное между баутами гибернации (спустя 15 часов, 1 день и 1 месяц после пробуждения; с T_M 36-38°C и ЧСС--150-300 уд./мин.);

Кроме указанных состояний, наблюдалась динамика пробуждения суслика из гибернации, спровоцированного в середине баута. Пробуждение является 2-3 часовым процессом, предоставляющим уникальную возможность сравнения температурных данных, подвижности и поведения животного.

В модели сравнения использовались крысы и мыши. Крысы охлаждались до 17-20°C с последующим восстановлением температуры тела до 36-37°C. Мыши с трансплантированными асцитными и солидными опухолями, также как и без опухолей охлаждались до 15-17°C и восстанавливали температуру тела до 36-37°C.

2.2. подготовка экспериментальных животных

В ноябре перед впадением в спячку сусликов помещали в деревянные боксы размером $20 \times 20 \times 25$ см и переносили в темную комнату с температурой от 1 до 3°C [1].

По методике, разработанной Игнатьевым (1992, 1998) проводился мониторинг функциональных состояний животных. В подстилку гнезд сусликов были вмонтированы термодатчики чувствительностью $0,2^{\circ}\text{C}$. В течение гибернации температура гнезда варьировала в диапазоне $1-4^{\circ}\text{C}$ в состоянии спячки и повышалась до $12-15^{\circ}\text{C}$ при пробуждении животных. Дважды в сутки показания термодатчиков регистрировались на самописце. Таким образом, по колебаниям температуры регистрировали длительность баутов гибернации. Их продолжительность составляла в среднем около одной недели в декабре, увеличивалась до 1,5-2 недель в январе-феврале и иногда до 3 недель у более крупных животных.

Пробуждение провоцировали во второй половине баута. В 10^{00} сусликов извлекали из гнезда. Для снятия электрокардиограммы (ЭКГ) на передней левой лапе и над лопаткой фиксировали игольчатые электроды. ЭКГ регистрировалась на электроэнцефалографе ЭЭП4-02.

Температуру мозга пробуждающихся животных оценивали по температуре в ушной раковине электротермометром (GTH-1150, GREISNGER electronic). Температуру тела измеряли ректально (датчик электротермометра вводили на глубину 5-6 см). В момент достижения температуры мозга и ректальной температуры заранее заданных границ, животные декапитировались. Между измерениями температуры в ушной раковине и после декапитации временной промежуток не превышал одной минуты. Температура мозга, определявшаяся сразу после декапитации, была всегда на $2-3^{\circ}\text{C}$ выше, чем в ушной раковине.

В экспериментах по изучению температурозависимого распределения рибосом в цитоплазме вкусовых клеток и нейронов гиппокампа суслики, пробуждающиеся из состояния зимней спячки, сравнивались с типичными «незимнеспящими» теплокровными — мышами и крысами, выходившими из состояния искусственной гипотермии.

В модели сравнения каждая крыса помещалась в герметично закрытый прозрачный сосуд объёмом 5,7 л. при температуре среды 2-4°C [Игнатьев, 1992, 1998]. Состояние крысы оценивалось визуально. В условиях нарастающих в результате дыхания гипоксии и гиперкапнии за 3-4 часа крысы охлаждались до температуры 15-20°C. Определялась частота сердечных сокращений, электроды также фиксировались на коже над лопаткой и на передней левой лапе. Если ЧСС эутермных животных составляла около 350-400 уд./мин., то ЧСС охлажденных крыс понижалась до 60-100 уд./мин. В течение 4-5 ч животные самостоятельно возвращались к нормотермии. В процессе разогрева температура тела измерялась ректально датчиком электротермометра аналогично измерениям температуры сусликов при пробуждении. В ряде опытов низкая температура пролонгировалась в течение дополнительных 5 часов введением внутрибрюшинно миорелаксанта (20%-раствора оксибутирата натрия) в объёме 0,2 мл и через каждый последующий час 0,2; 0,4; 0,5 мл соответственно. После декапитации животных определяли температуру мозга точечным электротермометром чувствительностью 0,2°C.

Мышам перевивали асцитную аденокарциному Эрлиха (культивируемую в ИТЭБ РАН). В бедро вводили по 400 тыс. клеток в растворе Хенкса. Внутрибрюшинно вводили по 800 тыс. клеток. Концентрации перевиваемых клеток определяли в камере Горяева [Козловская, Мартынова, 1975]. Анализ клеток как асцитных, так и солидных опухолей проводился на 5-7 сутки после инокуляции.

Мыши как здоровые, так и с трансплантированными опухолями, помещались в герметично закрытый сосуд объёмом 0,5-0,8 л (в зависимости от массы тела мыши) при температуре среды 13-14°C 4°C [Игнатьев, 1998]. Состояние животных контролировалось визуально. За 2-2,5 ч температура тела мышей падала до 14,5-17°C. Показанием к прерыванию охлаждения служила частота дыхания (7-11 в мин.). В ряде экспериментов искусственная гипотермия

продолговалась до 9 ч дополнительным охлаждением животного в диапазоне 16-26°C путем смачивания поверхности тела этиловым спиртом. На ауторагрев мышей до 35-37°C уходило около 3-3,5 часов (Рис.1). Температура тела измерялась ректально датчиком электротермометра ТЭП-1. Температуру мозга определяли после декапитации точечным электронным термометром с чувствительностью 0,2°C.

В связи с изучением морфо-функциональной организации мозга и быстро обновляющихся тканей мы не проводили какой-либо премедикации перед декапитацией животных, так как известно, что наркотизация влияет не только на работу мозга животных но и на пролиферативную активность их тканей.

2.3. подготовка ткани к микроскопии

После декапитации у животных выделяли язык и вырезали области, содержащие грибовидные, желобоватые и листовидные сосочки. Кожа забиралась с теменной области. Также выделялся гиппокамп, костный мозг, селезёнка и солидные опухоли. Клетки асцитных опухолей после лапаротомии отмывались из брюшной полости физраствором и центрифугировались при 500g. Полученные образцы фиксировали в 3 % параформальдегиде и 0,5 % глутаровом альдегиде на 0,1 М Na-какодилатном буфере (pH7,4) с добавлением 100 мМ сахарозы при фиксации вкусовых клеток. Фиксация продолжалась в течение 20 минут при комнатной температуре. Далее образцы троекратно промывались 0,1М Na-какодилатным буфером (pH7,4). В течение 1 часа при комнатной температуре образцы постфиксировались раствором 0,7 % OsO₄ на 0,1 М Na-какодилатном буфере (pH7,2-7,4) с 0,01% K₂Cr₂O₇. Ткань обезвоживалась последовательно в водных растворах этанола: 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 3 раза в 100% этаноле и 3 раза в 100% ацетоне при комнатной температуре по 15 минут в каждом.

Далее образцы выдерживали в смеси ацетон/эпоксидная смола (1:1) в течение 1ч при комнатной температуре. Образцы заключались в ту же смолу, состоящую из следующих компонентов: Araldite M, Epon 812, Epon Hardener

DDSA, Epon Accelerator DMP 30 (22,5 мл: 22,5 мл: 60 мл: 0,6 мл соответственно), пропитывались в термостате при температуре 37-40°C в течение 1 часа, и далее полимеризовались при 60-70°C в течение 2 суток.

Для резки образцов готовились стеклянные ножи на станке для изготовления стеклянных ножей фирмы LKB (Швеция).

Из полутонких срезов (0,5-2 μm), приготовленных на микротоме Reichert (Австрия), готовились препараты – по 30-500 последовательных серийных срезов. Для светомикроскопического исследования препараты окрашивались метиленовым синим и основным фуксином [Humphrey, Pittman, 1974].

Ультратонкие серийные и случайные срезы толщиной 70-80 нм готовились на ультрамикротоме шведской фирмы LKB. Срезы закреплялись на никель-палладиевые сеточки. Ультратонкие срезы контрастировались в насыщенном растворе уранилацетата на 70% этаноле в течение 5-10 минут. Промывались в 0,01 М растворе NaOH. Затем выдерживались 5-10 минут в растворе цитрата свинца и промывались в 0,01 М растворе NaOH. Полученные образцы исследовали на электронном микроскопе JEOL 100В при ускоряющем напряжении 80 kV.

2.4. микроскопия и количественный анализ

Подсчёт числа митотически активных клеток в эпителиях проводился с использованием стереологического анализа [Coggeshall, Lekan, 1996; West, 1999]. Для этого на листе бумаги чертилась колонка из 30-60 ячеек. Каждая ячейка соответствовала одному срезу на препарате. В каждой ячейке зарисовывался контур базальной пластинки соответствующего среза. Каждой вновь обнаруженной митотически активной клетке приписывался порядковый номер. Этот номер наносился на обрисованный контур в участке, соответствующем наблюдаемому на срезе. Каждая обнаруженная и пронумерованная клетка отслеживалась с выполнением описанных операций, на нескольких последующих срезах. Таким образом исключался как двойной учёт одной и той же клетки на различных срезах, так и потеря необходимых данных.

Длина среза измерялась окуляр-микрометром, цена деления которого сопоставлялась с линейкой объект-микрометра. Для каждого функционального состояния анализировались серии срезов, как минимум с трёх случайно выбранных образцов эпителия языка или кожи. Каждое значение для отдельного образца было получено при анализе в среднем $0,25 \text{ мм}^2$ поверхности эпителия языка или $0,25 \text{ мм}^2$ поверхности кожи.

Подсчёт числа митотически активных клеток в солидных опухолях проводился на случайных срезах без использования стереологического анализа. У каждого животного (Таблица 3) было изучено по три образца из различных участков опухоли. В каждом образце просчитано не менее 1000 клеток.

Исследование синтетической активности вкусовых клеток в различных моделях проводилось при сравнении с синтетической активностью гиппокампаальных нейронов. Распределение рибосом в апикальной приядерной цитоплазме подсчитывалось на площади не менее $11.2 \text{ }\mu\text{м}^2$ как вкусовой клеток, так и нейронов. Для каждого среднего значения мы использовали по 12 вкусовых клеток типа III из листовидных сосочков языка (определялись по наличию пучков промежуточных филаментов и везикул с плотной сердцевиной) и по 12-14 пирамидных нейронов гиппокампа поля CA3.

Статистическая обработка всех полученных данных проводилась с использованием пакета прикладных программ для анализа вариантов (ANOVA) (STATISTICA Software, Inc.). Таблицы результатов содержат средние значения и стандартные отклонения от средних значений.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. эпителий языка суслика

Грибовидные сосочки суслика распространены по всей дорзальной поверхности языка, вплоть до желобоватых сосочков (Рис.1). Исключением, видимо, является медиальная часть второй трети и две симметрично расположенные зоны без грибовидных сосочков в последней трети языка. В основном грибовидные сосочки расположены упорядочено, образуя двумерную сеть согласно структуре мышечного подслизистого слоя. В большинстве случаев прослеживается симметрия относительно медиальной плоскости сечения языка. Менее симметрично расположены сосочки в последней трети, что может быть связано с их неравномерным развитием в процессе онтогенеза.

Грибовидный сосочек имеет вкусовую почку, лежащую в соединительнотканном ложе и покрытую эпителиальными клетками (Рис. 9а). Капилляры и нервные окончания вплотную подходят к вкусовой почке, активно её питают. Взаимоотношения соединительнотканного окружения и вкусовой почки можно представить образно в виде руки с пальцами, обхватившими грушу (Рис. 9б). Грибовидный сосочек, аналогично нитевидным, располагается не вертикально, а с наклоном в сторону глотки. Это отнюдь не даёт преимуществ в сохранении самой почки при потреблении пищи, но сохраняет целостность базальных клеток вкусовой почки, нервных окончаний и капилляров и обеспечивая регенерацию почки при её повреждении. Большинство грибовидных сосочков имеет одну почку, но количество почек может быть больше в сосочках, расположенных ближе к корню языка. Уже в передней трети встречаются сосочки с двумя вкусовыми почками, а большие (диаметром 300-500 μm) грибовидные сосочки, лежащие непосредственно перед желобоватыми, могут содержать до восьми почек. Часто встречаются сосочки со сросшимися вкусовыми почками, и, следовательно, имеют число пор, соответствующее числу почек в этом сосочке (Рис. 9с).

В некоторых грибовидных сосочках встречаются почки, состоящие из темных и светлых клеток, но не имеющие вкусовой поры (Рис. 9d). Подобные вкусовые почки без вкусовых пор ранее наблюдались в экспериментах по денервации вкусовых сосочков и реже в норме [Whitehead et al. 1987; Miller, Smith, 1984].

Листовидные сосочки располагаются на задних латеральных поверхностях по обеим сторонам языка (Рис.1) в области коренных зубов, образуя 7-9 бороздок – складок эпителия, в которые открываются поры вкусовых почек, лежащие по обеим сторонам бороздки, и протоки Эбнеровских желёз (Рис. 1, 10a).

Нами обнаружено (Рис. 10b), что вкусовые почки в листовидных сосочках имеют регулярную структуру, образуя ряды, причём так, что основания почек одного ряда расположены напротив промежутков оснований почек соседнего ряда. В промежутках между рядами почек соединительная ткань, содержащая кровеносные сосуды и нервные окончания, образует выросты высотой до 1/3 почки. Такая упорядоченность почек может быть связана с более эффективной нейротрофической и гуморальной регуляцией.

Нами было подсчитано, что всего лишь на одной стороне средней (из 7-9 бороздок) бороздки листовидного сосочка в 14 рядах находится 71 вкусовая почка, т.е. в каждом ряду располагалось в среднем по 5 почек. В крайних рядах это число уменьшалось до 1-4. В редких случаях встречались ряды с шестью почками. Чаше же почки в ряду сливаются, и их трудно отделить друг от друга.

Вкусовые почки в эпителии *желобоватых сосочков* расположены так же, как в эпителии листовидных сосочков, с тем лишь отличием, что вкусовые почки расположены только на одной (внутренней) стороне бороздки (желобка).

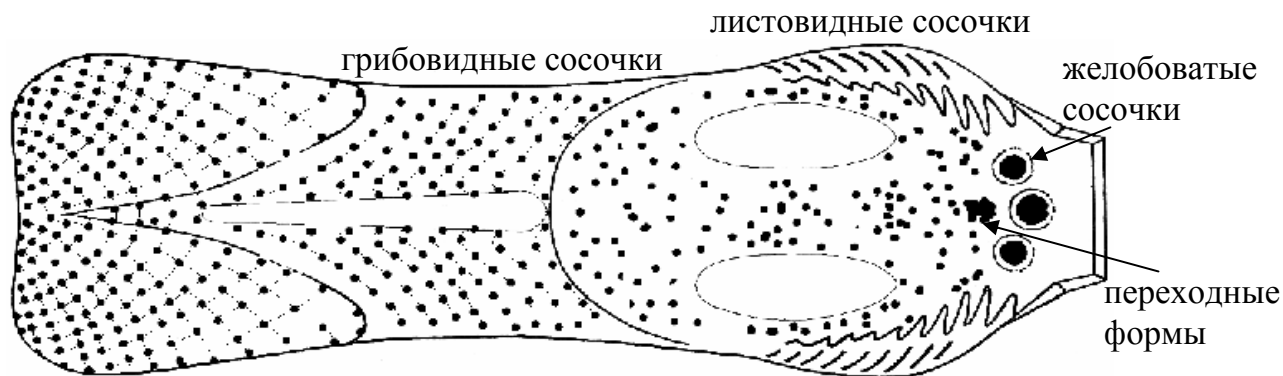


Рисунок 1. Схематическое изображение поверхности языка суслика показывает локализацию на нём вкусовых сосочков. От передней «осязательной» зоны вплоть до трёх желобоватых сосочков распространены грибовидные вкусовые сосочки (черные точки). На задних боковых поверхностях, подобно жабрам акулы, расположены листовидные сосочки.

Перед центральным из трёх желобоватых сосочков на поверхности языка у каждого четвертого суслика наблюдается эпителиальная структура, внешне похожая на желобоватый сосочек (Рис.1). В отличие от желобоватого сосочка такое эпителиальное образование представляет собой своеобразное поле «сросшихся» грибовидных сосочков, представляющих, по-видимому, переходные формы от желобоватых к грибовидным сосочкам (Рис. 11). Как и в желобоватом сосочке, вкусовые почки открываются внутрь складок эпителия, но вокруг этого поля отсутствует бороздка, свойственная желобоватым сосочкам.

3.2. клетки базального слоя эпителиев кожи и языка

При изучении организации эпителия языка гибернирующих сусликов в его базальном слое нами были обнаружены необычные по морфологии клетки диаметром 10-12 μm (Рис. 12). Они были округлены, цитоплазма просветлена, в центре клетки располагались хромосомы. Т.е. клетки были в митозе на стадии, подобной метафазе, однако веретено отсутствовало.

Ранее на клетках эпителия кишечника и костного мозга было показано, что подготовка животного к спячке сопровождается ингибированием и полным прекращением пролиферативных процессов при входе в баут гибернации, а фаза пробуждения сопровождается активацией митотической активности. Изучение эпителиальных клеток кишечника и желудка в течение гибернации сусликов показало накопление клеток в G_2 фазе и блокаду митотической активности [Vinogradova, 1982; Kruman, 1988]. Пики митотической активности в эпителии желудка наблюдались в первые несколько часов и на 3-4 день после весеннего пробуждения [Vinogradova, 1988]. Однако в этих работах детальный морфологический анализ эпителиев отсутствовал.

Присутствие «метафазных» клеток мы обнаружили и в базальном слое эпидермиса и его придатков в коже гибернирующих сусликов. Клетки так же легко было обнаружить по их округлённой форме и просветлённой цитоплазме. Хромосомы располагались в экваториальной части клетки (Рис. 13, 18).

Следует отметить, что проведенный нами морфологический анализ такой активно пролиферирующей гемопоэтической ткани, как костный мозг, также показал присутствие «метафазных» клеток в течение гибернации.

«Метафазные» клетки были видны в эпителии языка и при пробуждении сусликов, взятых из центра баута гибернации. Существенно, что эти клетки были видны до тех пор, пока температура тела животных не поднималась выше $33-34^{\circ}\text{C}$. При более высоких температурах эти клетки проходили все последующие стадии митоза (Рис. 14). Выявляемые у гибернирующих сусликов «метафазные» клетки крайне редко обнаруживались у активных животных. В состояниях зимней и летней активности можно было обнаружить типичные метафазные клетки, в которых хромосомы строго собирались в экваториальной плоскости и образовывали метафазную пластинку (Рис. 14).

Нам представлялось важным оценить число «метафазных» клеток в различных функциональных состояниях сусликов. Это было связано с тем, что холодная остановка клеток в митозе и, более того - в «метафазе», могла бы нам

дать новую информацию, например, о митотической активности различных пролиферирующих тканей гибернаторов по мере прохождения ими различных этапов зимней спячки. С этой целью мы провели сравнительный количественный стереологический анализ базальных слоев эпителиев (языка и кожи), взятых от сусликов в различных функциональных состояниях. Количественные данные представлены в Таблице 1 и 2.

Статистическая обработка показала, что как в эпителии языка, так и в эпидермисе кожи не было достоверных отличий между состояниями гибернации и спровоцированного пробуждения, когда температура тела животного не превышала 34°C. Согласно полученным нами данным (Табл.1, 2) количество митотически активных клеток (МАК) у летних животных превышало количество МАК гибернирующего животного практически в 5 раз. Количество МАК у нормотермных зимних сусликов превышало количество МАК активных летних в 2 раза. Такое увеличение числа митотически активных клеток у зимнего животного по сравнению с активным летним может быть объяснено синхронизацией, по крайней мере, митотических клеток у гибернирующих животных за счет того, что гибернация представляет исключительно циклический характер: многочисленные периоды 1-2 недельного холодового оцепенения сменяются краткими (1-2 дневными) периодами нормотермии. При этом очень важно, что длительность как холодового оцепенения, так и нормотермии превышает обычную длительность клеточного цикла. Другими словами, в 1-2 дневные периоды нормотермии митотически активные клетки не только синхронно вступают в митоз, но, по-видимому, также синхронно проходят и другие стадии клеточного цикла. С целью проверки обнаруженного нами эффекта холодовой синхронизации митотических клеток мы специально взяли суслика в конце сезона зимней спячки (26 марта 1999) и находящегося в центре баута гибернации. Поскольку обычно продолжительность митоза не превышает 5 часов мы декапитировали животное через 15 часов после спровоцированного пробуждения. Так, если количество МАК у нормотермных зимних животных, взятых в разное время сезона зимней спячки (обычно это

были животные, взятые в конце января-середине февраля, когда продолжительность холодового оцепенения максимальна, и, следовательно, легче выбрать животное в центре баута) превышало количество МАК у активных летних животных в 2 раза, то у животных, завершающих период зимней спячки, это количество достоверно возрастало более чем в 4 раза.

Таким образом, полученные нами данные (Табл.1, 2) убедительно свидетельствуют об эффекте синхронизации, по крайней мере, клеток вступающих в митоз.

Необходимо заметить, что как видно из таблицы 1 между гибернирующими животными, пробуждающимися, температура которых не превысила 33°C и животными с температурой выше 33°C нет достоверных отличий в количестве МАК. Отсутствие достоверных различий объясняется широким разбросом температур мозга в группах пробуждающихся животных (до 33°C и выше 33°C), вследствие чего в разных участках эпителиев можно видеть как клетки уже начавшие синхронное прохождение по следующим за метафазой стадиям митоза, так и клетки, все еще находящиеся в метафазе.

Таблица 1. Количество митотических клеток на 1 см² поверхности эпителия языка суслика

Функциональное состояние животного и температура мозга	Активный летний	Активный зимний (декабрь-январь)	Активный зимний (март)	Спровоцированное пробуждение до 33°C	Спровоцированное пробуждение выше 33°C	Гибернация
Активный летний	58071+/-10708 N=12					
Активный зимний (декабрь-январь)	F=8,25198 p=0,00818 достоверно отличны	125772+/-19203 N=15				
Активный зимний (март)	F=32,96536 p=3,89777E-5 достоверно отличны	F=6,07343 p=0,02402 достоверно отличны	223563+/-37979 N=5			
Спровоцированное пробуждение до 33°C	F=12,34825 p=0,00248 достоверно отличны	F=6,95777 p=0,01578 достоверно отличны	F=52,57128 p=1,64286E-5 достоверно отличны	11331+/-1639 N=8		
Спровоцированное пробуждение выше 33°C	F=0,53987 P=0,4725 достоверно НЕ отличаются	F=6,95777 p=0,01578 достоверно отличны	F=20,91394 p=0,00102 достоверно отличны	F=2,89258 p=0,11277 достоверно НЕ отличаются	42964+/-19904 N=7	
Гибернация	F=10,67171 p=0,00454 достоверно отличны	F=16,04779 p=6,93772E-4 достоверно отличны	F=45,32857 p=5,15162E-5 достоверно отличны	F=0,02223 p=0,88378 достоверно НЕ отличаются	F=2,46996 p=0,14202 достоверно НЕ отличаются	11635+/-1103 N=7

Таблица 2. Количество митотических клеток на 1 см² поверхности кожи суслика

Функциональное состояние	Активный Летний	Активный зимний	Спровоцированное пробуждение	Гибернация
Активный летний	46520+/-11955 N=3			
Активный зимний	F=22,53194 p=0,00145 достоверно отличны	12397+/-4452 N=7		
Спровоцированное пробуждение	F=28,38871 p=0,00109 достоверно отличны	F=2,47253 p=0,14415 достоверно НЕ отличаются	4779+/-234 N=6	
Гибернация	F=48,85856 p=2,29975E-5 достоверно отличны	F=3,83436 p=0,06908 достоверно отличны	F=0,10758 p=0,74777 достоверно НЕ отличаются	5056+/-630 N=10

Эффекта двукратного увеличения МАК не наблюдалось для эпидермиса кожи нормотермного зимнего животного по сравнению с активным летним. Это может быть связано с тем, что для эпидермиса кожи максимум митотической активности приходится на летние месяцы, когда происходит усиленный рост волос после летней линьки. Рост волосяного покрова заканчивается к концу августа в связи с подготовкой животного к гибернации. Новый волосяной покров выполняет крайне важную роль в процессах терморегуляции суслика по мере прохождения им баутов гибернации. Очевидно, что во время сезона зимней спячки рост волосяного покрова крайне ограничен, так как нарушение волосяного покрова могло бы привести животного к гибели. На низкую митотическую активность указывает и то, что при подсчёте митотических клеток кожи на 21 образце мы не обнаружили достоверных различий в количестве митотически активных клеток в наружных слоях эпидермиса и в волосяных

фолликулах, взятых вместе с сальными железами (52.8 ± 4.0 % и 47.2 ± 4.0 % соответственно; при $F=0,97465$; $p=0,32946$) независимо от функционального состояния животного.

3.3. стволовые клетки

В настоящее время хорошо известно, что митотическая активность большинства опухолей модулируется изменениями питания, кислородного обмена, гормонального статуса организма, суточными ритмами и др. [Франкфурт, 1975]. Стали классическими эксперименты по трансплантации стволовых клеток тератокарциномы в бластоцисты мышей [Stewart, Mintz, 1981], из которых развивались нормальные животные, причём из прежде злокачественной клетки образовывались многие, если не все типы нормальных клеток, в том числе половые клетки. Т.е. клетки тератокарциномы подвергались регуляторным воздействиям группы столь же малодифференцированных клеток бластоцисты, но не отвечали на регуляторные влияния взрослого организма.

Как уже было отмечено, подготовка животного к гибернации сопровождается ингибированием пролиферативных процессов [Kruman, 1988, 1992]. Способность клеток к пролиферации – это одно из важнейших свойств стволовых клеток взрослых животных. Поэтому «метафазные» клетки в процессе холодового оцепенения и их последующее прохождение по всем фазам митоза без каких-либо нарушений могли бы представить именно количественный пул стволовых клеток, синхронно вступающих в тот или иной промежуток времени в митоз. Такие попытки неоднократно предпринимались разными авторами для определения числа стволовых клеток в базальном слое эпидермиса кожи мышей и крыс. По разным приблизительным оценкам это число составляло 1 до 10% (McKenzie, Potten). До сих пор нет какого-либо относительно непредвзятого подхода для оценки числа стволовых клеток даже для эпителиальных тканей и костного мозга.

Кроме того, определение точного количества клеток базального слоя достаточно проблематично из-за полиморфизма клеток и высокой сложности его

рельефа. Литературные данные по данному вопросу отсутствуют, однако можно произвести теоретический подсчёт, исходя из среднего диаметра клетки базального слоя. Если средний диаметр такой клетки около 10 μm , то это даёт нам около 1.27×10^6 клеток базального слоя на 1 cm^2 кожи или эпителия языка. Согласно таблице 1, количество метафазных клеток среди клеток базального слоя было около 1% и 0,4% для эпителиев языка и кожи соответственно. Согласно распространённому мнению [Morrison et al., 1998], такие пролиферирующие клетки определяются как стволовые эпителиальные клетки. Существование стволовых клеток в кишечнике, гонадах, коже, и обонятельном эпителии может быть продемонстрировано непрямыми методами [Potten et al, 1990; Monti-Graziadei, Graziadei, 1979; Dym, 1994; Caggiano et al, 1994].

Очевидно, феномены сохранения пролиферативной активности у гибернирующего животного и задержка пролиферирующих клеток в «метафазе» даёт нам возможность впервые непосредственно наблюдать популяцию стволовых клеток *in vivo*. Наши результаты показывают, что стволовые клетки в эпителиях кожи и языка составляют около 0,4-1%. Большее количество стволовых клеток в эпителии языка связано со значительно большей неоднородностью рельефа базального слоя эпителия относительно кожи.

3.4. причины остановки клеток в «метафазах»

Как выше указывалось, гибернация суслика связана с мощными перестройками в гормональной системе [Wang, 1982], которые начинаются задолго до входа в гибернацию. Поэтому важно знать причину остановки клеток в «метафазах» *in vivo*: заключается ли она в понижении температуры, или же над температурными эффектами преобладают заблаговременные изменения гормонального статуса животного. Нами была предпринята проверка холодовых эффектов на животных, которым не свойственна естественная гибернация, и более того, на раковых асцитных и солидных опухолях. Используя физиологические эффекты гипоксии и гиперкапнии для выключения терморегуляторного центра в гипоталамусе [Игнатьев, 1998], мы вводили крыс,

здоровых мышей и мышей с трансплантированными опухолями (асцитная и солидная аденокарцинома Эрлиха) в состояние искусственной гипотермии.

В эпителии языка крыс, охлаждённых таким образом, мы обнаружили эффект, подобный таковому у сусликов – все без исключения митотически активные клетки базального слоя эпителия находились в «метафазах» (Рис. 15), число их составляло около 4000 клеток на 1 см² поверхности эпителия. После 4-5 часов разогрева животного до 35-37°C число митотических клеток восстанавливалось до количества делящихся клеток у животных с нормальной температурой тела и составляло около 60000 клеток на 1 см² поверхности эпителия, что близко к летним активным сусликам (Таблица 1).

Результаты на перевитых мышам опухолях оказались подобны полученным на пролиферирующих тканях здоровых животных. Мы использовали варианты гипотермии животных, различающиеся как по длительности, так и по её глубине. На Рис. 2 представлена зависимость температуры тела животного от времени восстановления после холодового воздействия. Как непосредственно после охлаждения, так и в течение 9 часов искусственной гипотермии митотически активные клетки опухолей находились в «метафазах», а после 2,5-3 часов разогрева тела до нормотермии клетки вступали в последующие фазы митоза.

Мы не ставили первостепенной задачей синхронизовать митотически активные клетки *in vivo*, но количественный анализ солидных опухолей контрольных, охлаждённых (до 16-18°C) и восстановивших температуру тела (до 36°C) животных показал, что достоверные отличия отсутствовали только между контрольными и восстановившими температуру до нормотермии (Таблица 3). Следовательно в течение охлаждения/восстановления происходит синхронизация клеток в “метафазах”.

Таблица 3. Митотический индекс в солидной аденокарциноме Эрлиха, в %.

Состояние животного	контроль	гипотермия	восстановление
контроль	2,0 $\pm$ 0,1 N=5		
гипотермия	F=8,32984 p=0,02032	3,2 $\pm$ 0,4 N=5	
восстановление	F=3,7191 p=0,10206	F=8,1503 p=0,029	1,6 $\pm$ 0,2 N=3

Наши результаты по холодовой синхронизации стволовых клеток *in vivo* оказались практически тождественны результатам, полученным ранее на культурах трансформированных клеток и клеток HeLa *in vitro* [Lesser, Brent, 1970]. В этом и предшествующих исследованиях был предложен метод холодового накопления митотических клеток без повреждения последующего их синхронного роста. Позднее Boucher and Norman (1980) предложили метод синхронизации холодным шоком незрелых гранулоцитов из периферической крови и костного мозга с целью получения увеличенного сбора метафазных клеток, используемых для цитогенетических исследований гематологических пациентов. Все эти способы связаны с тем, что в монослойных культурах набухшие и округлившиеся клетки, вступившие в метафазу, легко отделяются от субстрата простым встряхиванием. Одновременно исследования *in vitro* показывают, что остановка клеток в митозе и, в том числе, в метафазе обеспечивается исключительно холодом. Следовательно, наши результаты по остановке клеток в метафазах как для гибернаторов, так и для негибернаторов также показывают главенствующую роль холода, а не возможных изменений в гормональном статусе охлажденных животных. Очевидно, что основными

периодами синхронизирующего воздействия температуры у суслика являются вход в баут гибернации и выход из него.

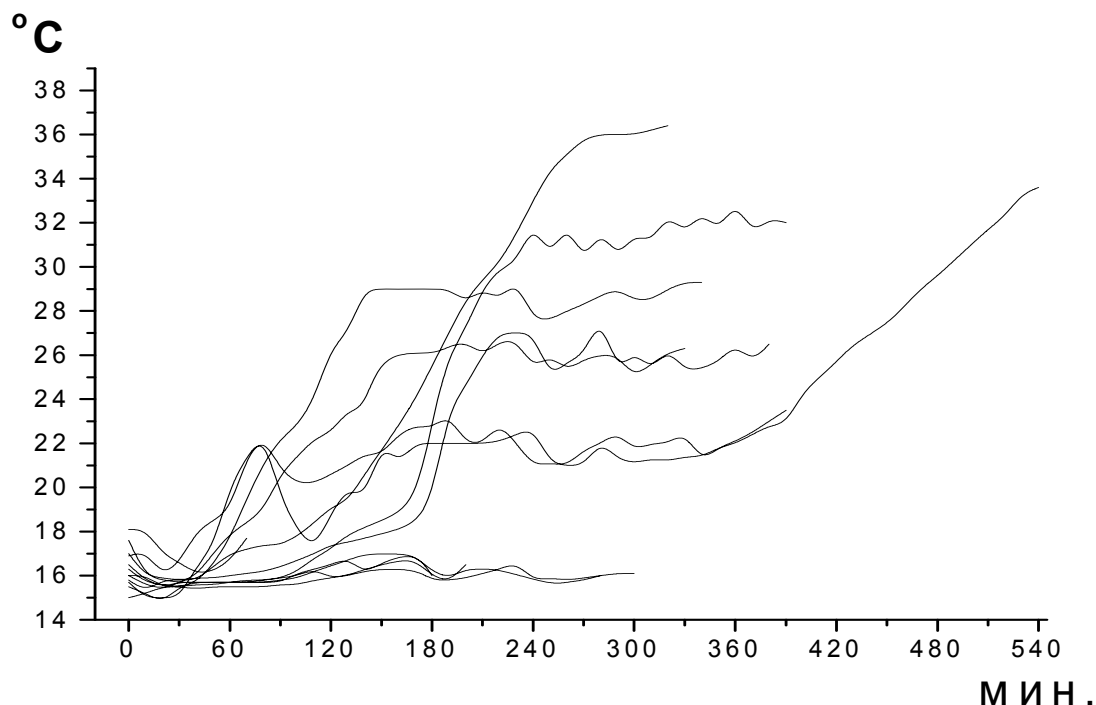


Рисунок 2. Увеличение ректальной температуры мышей после охлаждения в закрытом сосуде. Гипотермические состояния мышей различались по глубине и длительности в сериях экспериментов.

Для понимания того, что произошло после охлаждения, мы провели ультраструктурный анализ «метафазных» клеток как из эпителиев языка суслика и крысы, так и асцитных и солидных опухолей аденокарциномы Эрлиха (Рис. 16). Ультраструктурный анализ различных «метафазных» клеток показал (Рис.17, 18), что:

- а) в этих клетках произошла конденсация хроматина и репликация центриолей, т.е. клетки уже прошли профазу;
- б) исчезновение ядерной оболочки и локализация хромосом вблизи экваториальной пластинки, а также формирование кинетохоров свидетельствуют о том, что эти клетки находятся на стадии, близкой к метафазе;

- с) отличительной особенностью таких «метафазных» клеток является аккумуляция реплицированных центриолей только на одном полюсе, т.е. центриоли не способны к миграции;
- д) существенной особенностью холодowych «метафазных» клеток является отсутствие микротрубочек; присутствуют только небольшие их фрагменты.

Таким образом, на микрофотографиях видно, что микротрубочки веретена деления этих клеток отсутствуют. Ядерная оболочка, аппарат Гольджи и эндоплазматическая сеть представлены в основном везикулами. Хромосомы располагаются в центре клетки, образуя «чашу» вокруг одного полюса, на котором сконцентрированы уже реплицированные центриоли. В пространстве между хромосомами и центриолями наблюдаются олигомеры микротрубочек. Кинетохоры хромосом собраны или находятся в процессе сборки. На одном ультратонком срезе такой клетки можно наблюдать сразу до 10 кинетохоров, ориентированных в сторону центриолей.

Клетки, остановленные в митозе, сложно отнести как к профазе, так и к типичной метафазе, когда хромосомы собираются в центре клетки. С одной стороны, отсутствие микротрубочек веретена деления и концентрация центросом на одном полюсе клетки являются признаки профазы. С другой стороны, разборка ядерной мембраны, наличие в центре клетки хромосом с кинетохорами и уже реплицированные центросомы – признаки метафазы. По-видимому, мы наблюдаем нетипичную метафазу митоза, где механизмы, ответственные за сборку микротрубочек веретена деления принимают непосредственное участие. В связи с этим кажется вполне вероятным, что именно микротрубочки ответственны за расхождение центросом по полюсам клетки, в то время как их отсутствие не влияет на миграцию хромосом в экваториальную область клетки.

При сравнении ультраструктуры метафазных клеток эпителиев гибернирующих сусликов, охлаждённых крыс и опухолей мышей существенных различий обнаружено не было (Рис. 17, 18).

Полученные результаты позволяют сделать следующие выводы:

- а) остановленные в митозе клетки гибернирующего животного возможно

являются стволовыми клетками;

- б) холодовое переживание делящихся стволовых клеток гибернирующего суслика осуществляется в нетипичной для нормотермных животных метафазе, и стадия метафазы в этом случае является превалирующей как в митотическом, так и в клеточном цикле стволовой клетки в случае естественной гибернации;
- с) остановка и синхронизация клеток в метафазах в течение гибернации осуществляются благодаря холодной деполимеризации микротрубочек веретена деления и такая задержка стволовых клеток в метафазе проявляет прямой цитостатический эффект температуры, не превышающей 32-33°C, а также то, что данный феномен не требует заблаговременного изменения гормонального статуса организма и является универсальным для всех пролиферирующих тканей теплокровных животных, или по крайней мере грызунов.

3.5. эффекты гипотермии в дифференцированных клетках

Предыдущими работами на сусликах было показано, что при входе животного в состояние гибернации как во вкусовых клетках, так и в нейронах ЦНС происходит редукция белоксинтезирующего аппарата, а после выхода из гибернации и при достижении температур тела и мозга до 29-31°C биосинтез восстанавливался [Барышникова, 1998; Gordon et al., 1998]. То есть процессы, происходящие в нейронах и вкусовых клетках подобны.

Как крысы, так и суслики, относящиеся к грызунам, имеют три типа вкусовых сосочков на языке. Уже упоминалось, что жизнь вкусовой клетки (как и эпителиальной) составляет около 10 дней [Farbman, 1980], которая заканчивается апоптозом [Lindeman, 1996]. Следовательно, 50-60 клеток, составляющих вкусовую почку, могут находиться на разных этапах быстро протекающей терминальной дифференцировки и менять не только уровни синтетической активности, но и свои морфологические признаки. Ещё большие изменения должны претерпевать стволовые клетки.

В отличие от вкусовых клеток, и тем более от стволовых клеток эпителиев, время жизни нейрона определяется временем жизни организма. Вследствие этого, именно на нейронах обладающих большей функциональной пластичностью при сохранении своих свойств как дифференцированной клетки можно было бы выяснить, где конкретно находятся точка приложения температурного воздействия на клетку.

Мы сравнили биосинтетическую активность вкусовых клеток типа III из листовидных сосочков и пирамидных нейронов гиппокампа поля СА3 у сусликов и у негипернирующих в норме животных (у мышей и крыс). Уровень биосинтетической активности мы определяли по количеству свободных рибосом, полисом и мембрансвязанных полисом в апикальной зоне цитоплазмы клеток у активных и охлаждённых животных. Полученные данные представлены в таблицах 4-8. На рисунках 3-8 можно наблюдать температурную зависимость распределения рибосом в относительных величинах.

Таблица 4. Температурозависимое распределение рибосом в цитоплазме вкусовых клеток типа III у сусликов

температура мозга, пол	дата забора материала	моносомы $/\mu\text{m}^2$	полисомы ретикулума $/\mu\text{m}^2$	свободные полисомы $/\mu\text{m}^2$	все рибосомы $/\mu\text{m}^2$
2°C м	10.02.98	936+/-63	4+/-2	0	940+/-63
4°C ж	27.01.98	1045+/-77	27+/-8	0	1072+/-74
9°C м	28.01.97	960+/-22	15+/-4	14+/-5	989+/-24
15°C м	04.01.97	780+/-56	17+/-6	0	797+/-58
19°C м?	22.01.97	519+/-46	25+/-8	41+/-10	584+/-48
24°C м	31.01.96	661+/-61	33+/-9	27+/-8	722+/-63
27°C ж	03.02.98	541+/-28	40+/-8	30+/-3	610+/-52
28°C м	05.02.98	504+/-51	35+/-9	9+/-3	548+/-48
30°C м	05.02.98	599+/-34	30+/-6	37+/-4	666+/-37
34°C м	15.01.98	425+/-32	27+/-5	113+/-12	565+/-41
37°C м	28.02.96	449+/-37	98+/-19	122+/-24	669+/-52

Таблица 5. Температурозависимое распределение рибосом в цитоплазме пирамидных нейронов гиппокампа поля СА3 у сусликов

Температура мозга, пол	дата забора материала	моносомы $/\mu\text{m}^2$	полисомы ретикулума $/\mu\text{m}^2$	свободные полисомы $/\mu\text{m}^2$	все рибосомы $/\mu\text{m}^2$
3°C ж	28.01.97	1191+/-34	2+/-1	2+/-1	1195+/-34
14-15°C м	24.03.99	1151+/-23	84+/-11	26+/-8	1260+/-25
19°C м	22.01.97	925+/-55	45+/-10	67+/-14	1035+/-49
32°C ж	13.02.97	604+/-26	17+/-2	84+/-6	706+/-30
34-35°C м	28.02.96	491+/-28	35+/-9	465+/-41	991+/-42
36-37°C ж	06.03.97	462+/-28	53+/-10	342+/-24	857+/-53

Таблица 6. Температурозависимое распределение рибосом в цитоплазме вкусовых клеток типа III у крыс

температура мозга	моносомы $/\mu\text{m}^2$	полисомы ретикулума $/\mu\text{m}^2$	свободные полисомы $/\mu\text{m}^2$	все рибосомы $/\mu\text{m}^2$
нормотермия	204+/-12	34+/-10	89+/-8	327+/-17
гипотермия около 18°C	530+/-49	32+/-4	41+/-4	603+/-54

Таблица 7. Температурозависимое состояние рибосом в цитоплазме пирамидных нейронов гиппокампа поля СА3 у крыс

температура мозга	моносомы цитозоля $/\mu\text{m}^2$	полисомы ретикулума $/\mu\text{m}^2$	свободные полисомы $/\mu\text{m}^2$	все рибосомы $/\mu\text{m}^2$
нормотермия	117+/-9	66+/-10	251+/-10	434+/-21
гипотермия около 17°C	712+/-46	34+/-5	58+/-7	804+/-49
гипотермия 20-22°C “тёмные” нейроны	875+/-8	47+/-9	65+/-3	987+/-5
гипотермия 20-22°C “светлые” нейроны	212+/-6	61+/-3	575+/-8	848+/-13

Таблица 8. Температурозависимое распределение рибосом в цитоплазме вкусовых клеток типа III у мышей

температура мозга	моносомы $/\mu\text{m}^2$	полисомы ретикулума $/\mu\text{m}^2$	свободные полисомы $/\mu\text{m}^2$	все рибосомы $/\mu\text{m}^2$
нормотермия	283+/-23	37+/-5	101+/-10	428+/-33
гипотермия около 17°C	389+/-30	40+/-5	20+/-3	448+/-29

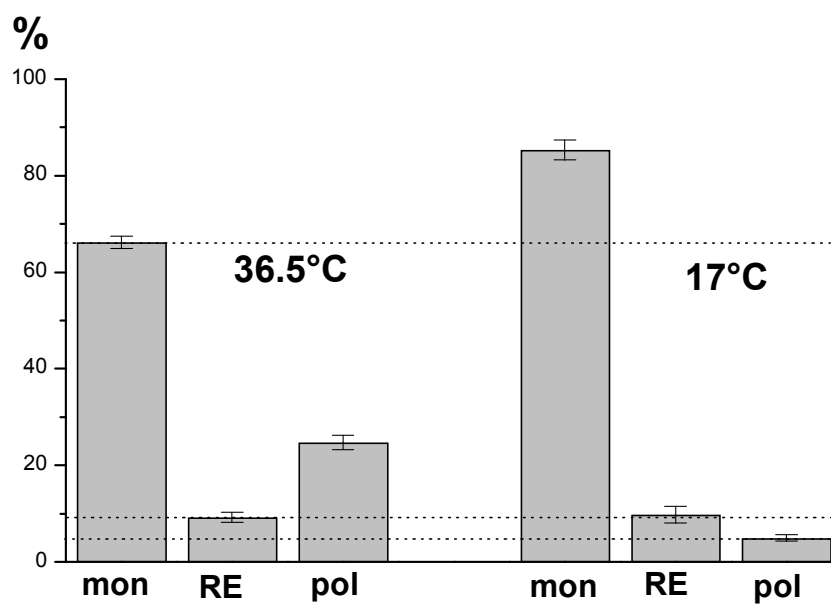


Рисунок 3. Температурозависимое распределение рибосом в цитоплазме вкусовых клеток типа-III у мыши при нормотермии и гипотермии.

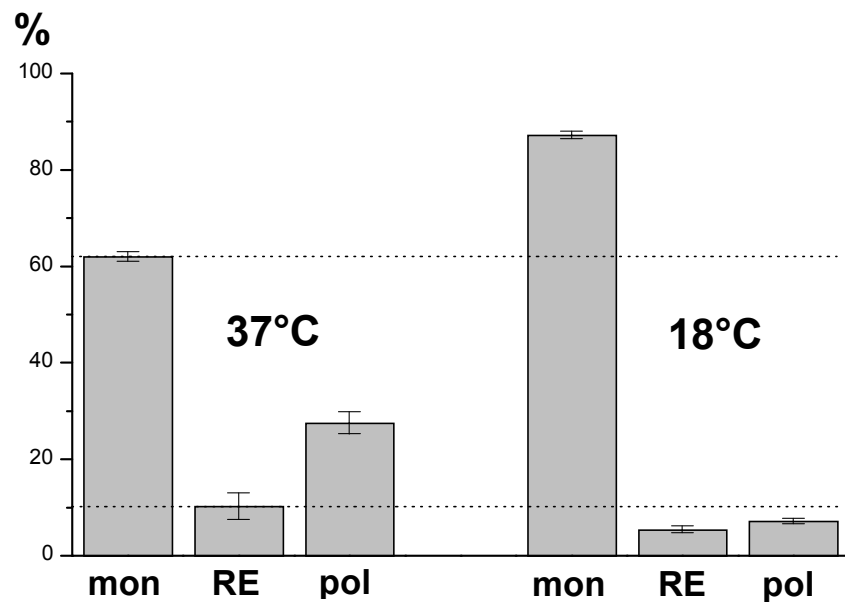


Рисунок 4. Температурозависимое распределение рибосом в цитоплазме вкусовых клеток типа-III у крысы при нормотермии и гипотермии.

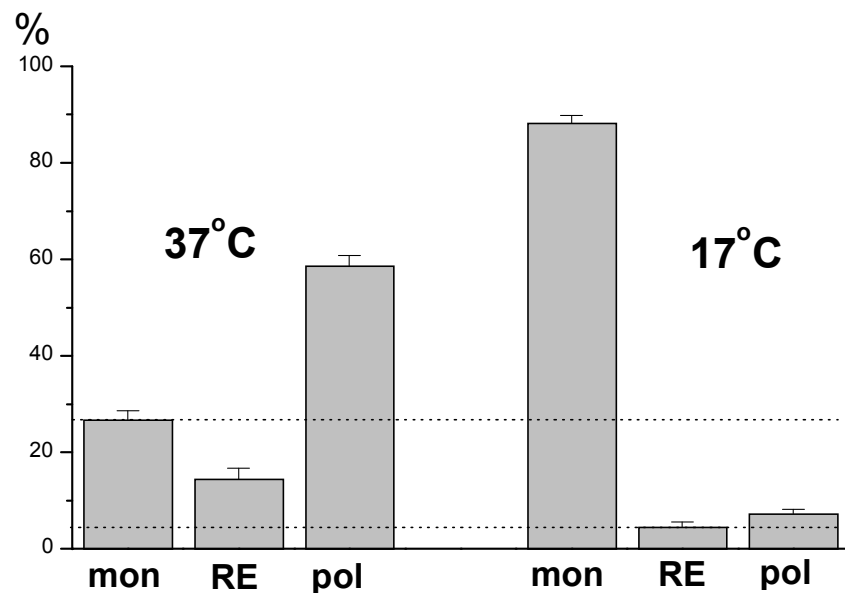


Рисунок 5. Температурозависимое распределение рибосом в цитоплазме нейронов поля СА3 гиппокампа крысы при нормотермии и гипотермии.

Процентные соотношения свободных полисом, мембраносвязанных полисом и свободных рибосом в нейронах гиппокампа суслика в зависимости от температуры мозга при пробуждении представлены на Рис. 6. Можно видеть, что выделяются две температурные зоны с увеличением количества свободных полисом в диапазонах 15-20°C и 32-35°C.

От первичного подъёма уровня свободных полисом (при 15-20°C) вплоть до температуры мозга около 32°C наблюдался незначительное увеличение количества свободных полисом (на 4%) при примерно постоянном соотношении моносом и связанных полисом. При 15-20°C в нейронах гиппокампа обнаруживается незначительное увеличение числа свободных полисом. Как известно, в глубокой спячке гиппокамп выполняет свои сторожевые функции, принимая непосредственное участие в процессах гибернации и пробуждения [Штарк, 1970]. Незначительные колебания в распределении рибосом в цитоплазме гиппокампальных нейронов суслика при пробуждении до 32°C можно объяснить тем, что в течение гибернации в нейронах гиппокампа продолжают синтетические процессы, направленные на поддержание сторожевых функций.

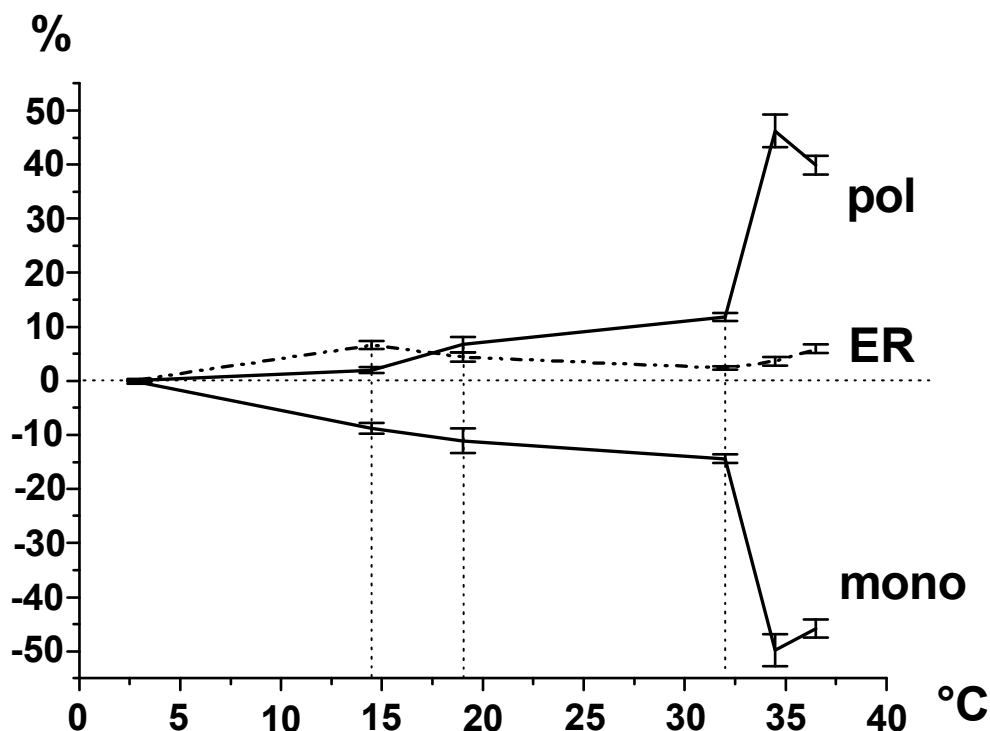


Рисунок 6. Температурозависимое распределение рибосом в цитоплазме нейронов поля СА3 гиппокампа у суслика при пробуждении. Нуль по оси Y соответствует общему (100%) количеству рибосом в клетках. Ось Y выше нуля отражает увеличение, а ниже нуля падение количества рибосом, относительно общего количества.

На светомикроскопическом уровне было замечено, что пирамидные гиппокампальные нейроны всех экспериментальных животных различны по уровню связывания обычных красителей (Рис. 19). При нормотермии выделялись зоны с большим или меньшим количеством «светлых» и «тёмных» нейронов. У гибернирующих сусликов или мышей и крыс в состоянии искусственной гипотермии подавляющее большинство пирамидных нейронов выглядело как «тёмные» нейроны. При ультраструктурном анализе этих двух типов нейронов у крыс, поднявших температуру своего тела с 16-18°C до 20-22°C, количество свободных полисом в «тёмных» и «светлых» нейронах резко различалось (Рис.7). Количество полисом в цитоплазме «светлых» нейронов более чем в 10 раз превышало количество полисом в «тёмных» нейронах. По-видимому, электронная плотность клеток соответствует низкому уровню их синтетической и функциональной активности. В этой связи чрезвычайно

интересны экспериментальные и литературные данные, освещённые в монографии Штарка (1970). В экспериментах по искусственному и естественному пробуждению зимоспящих животных (суслики, сони, ежи и др.) диапазон температуры тела от 18°C до 20°C соответствовал на энцефалограммах появлению признаков проведения сигналов в специфических проводящих каналах мозга и связывалось с активацией системы внутриклеточного транспорта, непосредственно участвующей экзоцитозе нейромедиаторов и релизинг-факторов гипофиза, необходимых в процессе пробуждения гибернатора. Не наблюдается противоречий в том, что морфо-функциональная организация белоксинтезирующего аппарата гиппокампальных нейронов суслика при гибернации и пробуждении подобна таковой у крыс при искусственной гипотермии и на начальных этапах выхода из неё. Как видно, первые признаки пробуждения коррелируют с началом активации синтеза цитоплазматических белков при 15°C, а незначительное увеличение свободных полисом у суслика при 15-20°C может соответствовать активации главным образом «светлых» нейронов, как это можно видеть, например, при восстановлении температуры мозга у крыс.

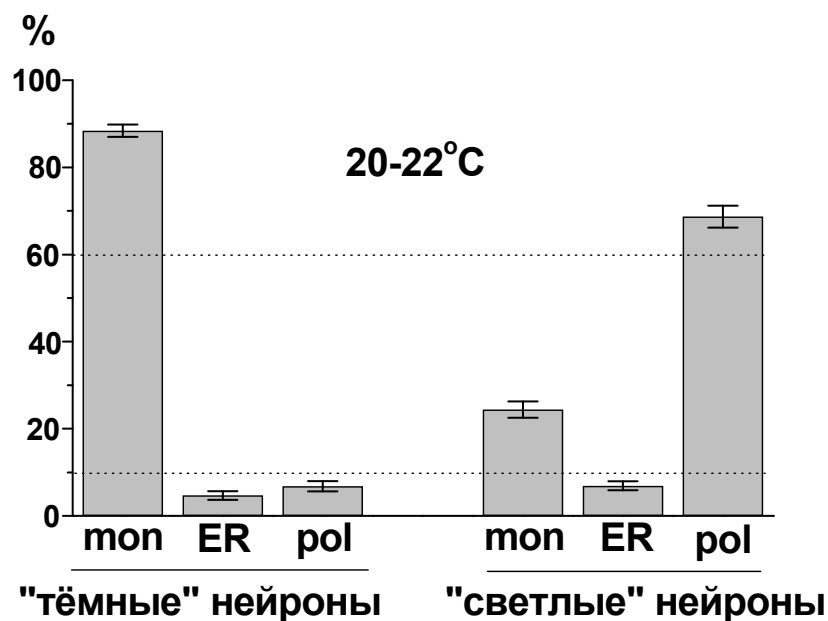


Рисунок 7. Температурозависимое распределение рибосом в цитоплазме "светлых" и "тёмных" нейронов поля СА3 гиппокампа крысы при гипотермии.

Пока можно только предполагать, какие факторы отвечают за поддержание синтетической активности «светлых» нейронов и (или) синтез каких белков происходит в них при температурах ниже или около 20°C. Так или иначе, функциональная активность нейронов напрямую связана с изменениями температуры тела животного, как в процессе пробуждения, так и в состоянии холодового оцепенения и отражает высокую температурную пластичность нейронов древней коры.

Менее дифференцированные клетки в отличие от нейронов более подвержены гипотермическим воздействиям, на что указывают значительные колебания в перераспределении рибосом во вкусовых клетках типа-III в процессе пробуждения. На Рис.8 можно видеть, что во вкусовых клетках выделяются две температурные зоны с ещё более выраженным увеличением количества свободных полисом по сравнению с нейронами гиппокампа. Эти зоны находятся в диапазонах 15-20°C и 30-34°C. Диапазон 26-34°C во вкусовых

клетках пробуждающихся *C. undulatus* соответствует быстрому перераспределению рибосом между ретикулулом и цитозолем. После прохождения порога в 28°C во вкусовых клетках суслика резко возрастает количество свободных полисом до 34°C, после чего наблюдается увеличение количества полисом, связанных с ретикулулом.

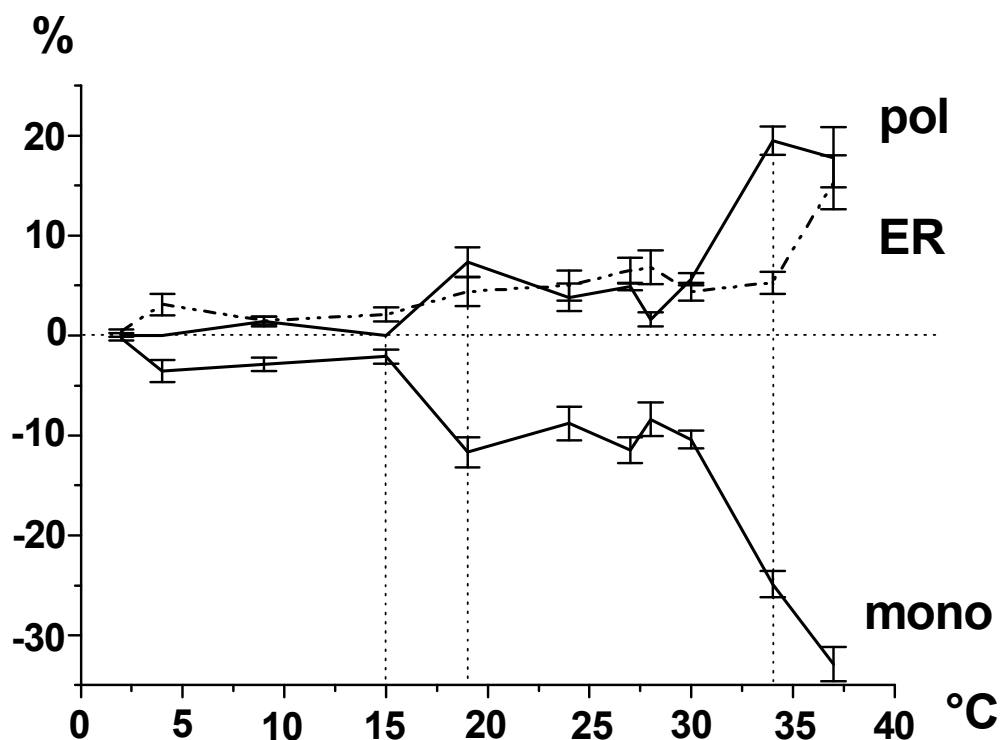


Рисунок 8. Температурозависимое распределение рибосом в цитоплазме вкусовых клеток типа-III у суслика при пробуждении. Нуль по оси Y соответствует общему (100%) количеству рибосом в клетках. Ось Y выше нуля отражает увеличение, а ниже нуля падение количества рибосом, относительно общего количества.

Как было указано, при температурах ниже 34°C мы не встречали в эпителии языка анафазных клеток. Это является подтверждением того, что в диапазоне 28-34°C происходит усиленный синтез цитоскелетных белков или белков, регулирующих активность системы быстрого внутриклеточного транспорта, завязанного на микротрубочках, в том числе активность моторных

белков и других белков связанных с микротрубочками (microtubule-associated proteins – MAPs), которые необходимы также для восстановления микротрубочек веретена деления в синхронизированных в метафазах клетках в течение гипотермии.

3.6. стволовые клетки вкусовых почек

Известно, что в нейронах микротрубочки стабилизируются с помощью белков, связанных с микротрубочками [Bruce Alberts et al., 1994]. Согласно литературным данным [Kobayashy, Mundel, 1988] как в нейронах, так и в других клетках имеется широкий набор MAPs, которые способны стабилизировать микротрубочки. Так как мы наблюдаем интактные микротрубочки во вкусовых клетках в течение гибернации, то встаёт вопрос: приложимы ли холодовые эффекты к базальным (стволовым) клеткам вкусовых почек в эпителии языка суслика, поскольку они дифференцируются в нейроэпителиальные вкусовые клетки?

Оказалось, что микротрубочки базальных (стволовых) клеток вкусовой почки также, как и клетки базального слоя эпителия, подвержены холодовому воздействию. В таком случае можно утверждать, что пул микротрубочек веретена деления стволовых клеток как эпителиев, так и вкусовых почек отличается от пула микротрубочек клеток, находящихся в процессе дифференцировки, а следовательно стволовым клеткам вкусовой почки свойственны те же эффекты холодовой синхронизации, что и эпителиальным клеткам языка.

При проведении стереологического анализа эпителия языка гибернирующего и активного зимнего суслика показано, что все типы вкусовых сосочков языка содержали не более 2 митотически активных клеток как в базальных, так и в базолатеральных положениях почек, причём митотические клетки чаще располагались раздельно на противоположных сторонах базальной части вкусовой почки (Рис. 20). Для оценки количества почек, содержащих метафазные клетки, мы проанализировали около 300 серийных срезов (по 2 μm

толщиной) листовидного сосочка гибернирующего суслика (февраль). На срезах почки наблюдались в продольном разрезе, так что была видна как вкусовая пора, так и базальная пластинка. Количество почек определялось не прямо, а по количеству вкусовых пор, поскольку при данной ориентации срезов очень сложно дифференцировать одну почку от соседней за счёт их частого слияния. Мы определили, что 9% почек (32 почки) из 339 обнаруженных содержали хотя бы одну метафазную клетку. И только 3% от всех обнаруженных почек имели по 2 метафазных клетки.

На срезах, перпендикулярных вкусовым почкам, в одной бороздке листовидного сосочка (200 серийных срезов по 1 μm толщиной) зимнего нормотермного суслика (декабрь) было подсчитано, что из 113 вкусовых почек 16% почек содержали делящиеся клетки, 4-5% почек (5 из 113 почек) содержали по 2 митотических клетки, которые находились в различных фазах митоза. То есть во вкусовых почках нормотермного зимнего суслика делящихся клеток было в 1,5 раза больше, чем у гибернирующего животного.

Мы не обнаружили вкусовых почек с тремя митотически активными базальными клетками ни в одном из двух функциональных состояний, ни при гибернации, ни при зимней нормотермии.

Таким образом, мы определили, что во вкусовой почке можно наблюдать 2 базальные стволовые клетки, которые так же подвержены влияниям температуры, как и стволовые клетки эпителиев языка и кожи. Наличие двух стволовых клеток во вкусовой почке предполагает существование двух линий дифференцировки вкусовых клеток, когда одна из стволовых клеток даёт начало тёмным вкусовым клеткам типа-I, а другая – светлым клеткам типа-II и типа-III.

3.7. морфо-функциональная пластичность вкусовых почек

При изучении холодового воздействия на базальные клетки вкусовых почек стереологический анализ срезов толщиной 0,5-1 μm позволил нам подробнее изучить гистологию вкусовой почки.

Вкусовая почка млекопитающих, согласно данным многих авторов [Lindemann, 1996; Kinnamon, 1985, 1988], образована приблизительно 50-60 вкусовыми клетками. Базальная часть этих клеток контактирует с базальной пластинкой. Апикальные части вкусовых клеток контактируют с внутренней камерой вкусовой почки. Внутренняя камера вкусовой почки заполнена микроворсинками вкусовых клеток, обеспечивающих высокую подвижность секретируемых клетками соединений и поступающих через пору вкусовых стимулов. Внутренняя камера вкусовой почки через вкусовую пору диаметром до 10 μm связана с поверхностью языка. Таким образом, наличие вкусовой поры и секрета вкусовых клеток во внутренней камере почки считается необходимым условием её функционирования. Указанные особенности отражают классическое представление об организации вкусовой почки млекопитающих.

В литературе редко указывается на присутствие аномальных вкусовых почек. Обычно упоминаются почки, у которых пора не выявляется гистохимическими методами. «Потеря» почкой поры часто наблюдается после денервации вкусовых почек в ходе эксперимента [Hou et al.1985; Sloan et al.1983; Whitehead et al.1987]. Лишь в единственной доступной работе говорится, что при тотальном подсчёте вкусовых почек у хомячка почки без вкусовой поры составляли менее 0,1%; однако следует отметить, что морфологическое исследование проводилось на парафиновых срезах толщиной 8 μm [Miller, Smith, 1984]. В пренатальный период пора во вкусовой почке отсутствует [Farbman and Mbiene, 1991].

Во всех типах вкусовых сосочков суслика на полутонких срезах (1 μm и менее) мы обнаружили ответвления вкусовых клеток от основной оси вкусовой почки, которую можно провести от центра базальной части до вкусовой поры. Значительная часть ответвляющихся от почки вкусовых клеток, образует вкусовую пору с диаметром не более 1 μm . Некоторые вкусовые почки имеют более одного ответвления (Рис. 21). В одной из бороздок листовидного сосочка суслика было подсчитано, что 113 почек имеет 15 ответвлений вкусовых клеток.

Такие же ответвления вкусовых клеток от почек мы обнаружили при исследовании листовидных и желобоватых сосочков домашней кошки и морской свинки. При электронно-микроскопическом исследовании таких ответвлений в листовидных сосочках суслика и в желобоватом сосочке морской свинки (Рис. 22) было установлено, что они образованы светлыми и тёмными вкусовыми клетками. Как между собой, так и с окружающими кератиноцитами эти клетки образуют десмосомальные контакты. В тёмных клетках электронно-плотная цитоплазма заполнена рибосомами и хорошо развитым шероховатым ретикулумом. Тёмные клетки по ходу ответвления от почки обволакивают светлую клетку, изолируя от эпителиальных клеток и, следовательно, относятся к клеткам типа-I. Светлые клетки содержат пучки промежуточных филаментов и везикулы с электронно-плотной сердцевиной и, следовательно, относятся к клеткам типа-III.

Данные результаты позволяют предположить, что функциональной единицей периферического отдела вкусового анализатора может являться группа из одной светлой клетки типа-III, тёмной изолирующей клетки типа-I и стволовых клеток. Это предположение вполне согласуется с результатами, описанными выше (см. разд. Стволовые клетки во вкусовых почках) и с предположением о наличии двух линий стволовых клеток во вкусовой почке. В таком случае одна базальная клетка почки должна давать начало тёмным вкусовым клеткам типа-I, а другая базальная клетка – светлым клеткам типа-II и типа-III.

Обозначения на микрофотографиях и рисунках

- b** - базальная пластинка
- br** - вкусовая клетка ответвляющаяся от вкусовой почки
- ch** - хромосомы
- et** - соединительная ткань
- DC** - «темная» вкусовая клетка – тип-I
- dj** - десмосомальные контакты
- ec** - эпителиальные клетки
- ER** - мембран-связанные рибосомы
- G** - комплекс Гольджи
- If** - промежуточные филаменты
- k** - кинетохор
- LC** - светлая вкусовая клетка
- m** - «метафазная» клетка
- mon** - моносомы
- N** - нервное волокно или окончание
- NE** - ядерная оболочка
- Po** - вкусовая пора
- pol** - свободные полисомы
- TB** - вкусовая почка

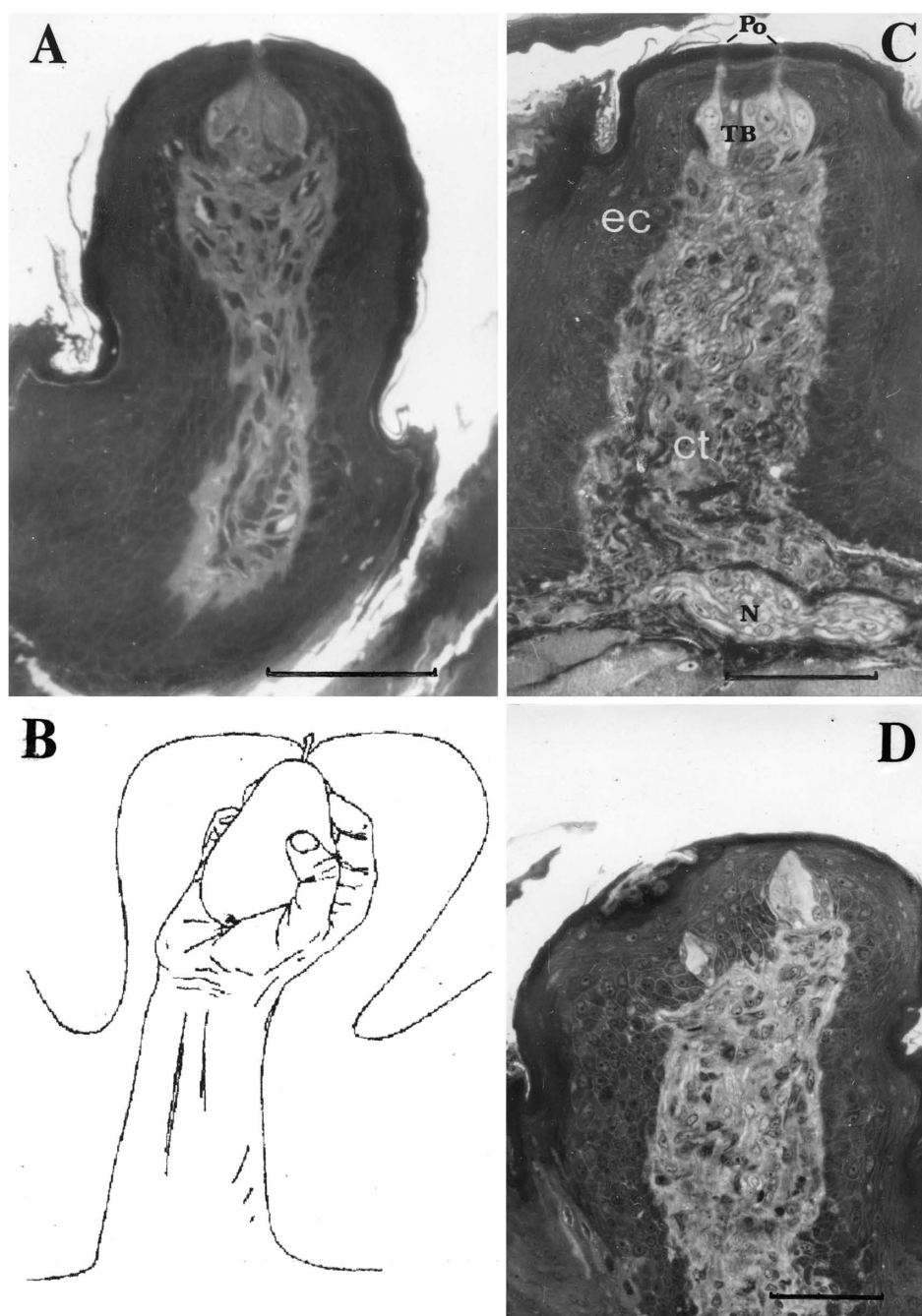


Рисунок 9. Грибовидные вкусовые сосочки языка суслика (пояснение в тексте). Шкала= 60 μ m.

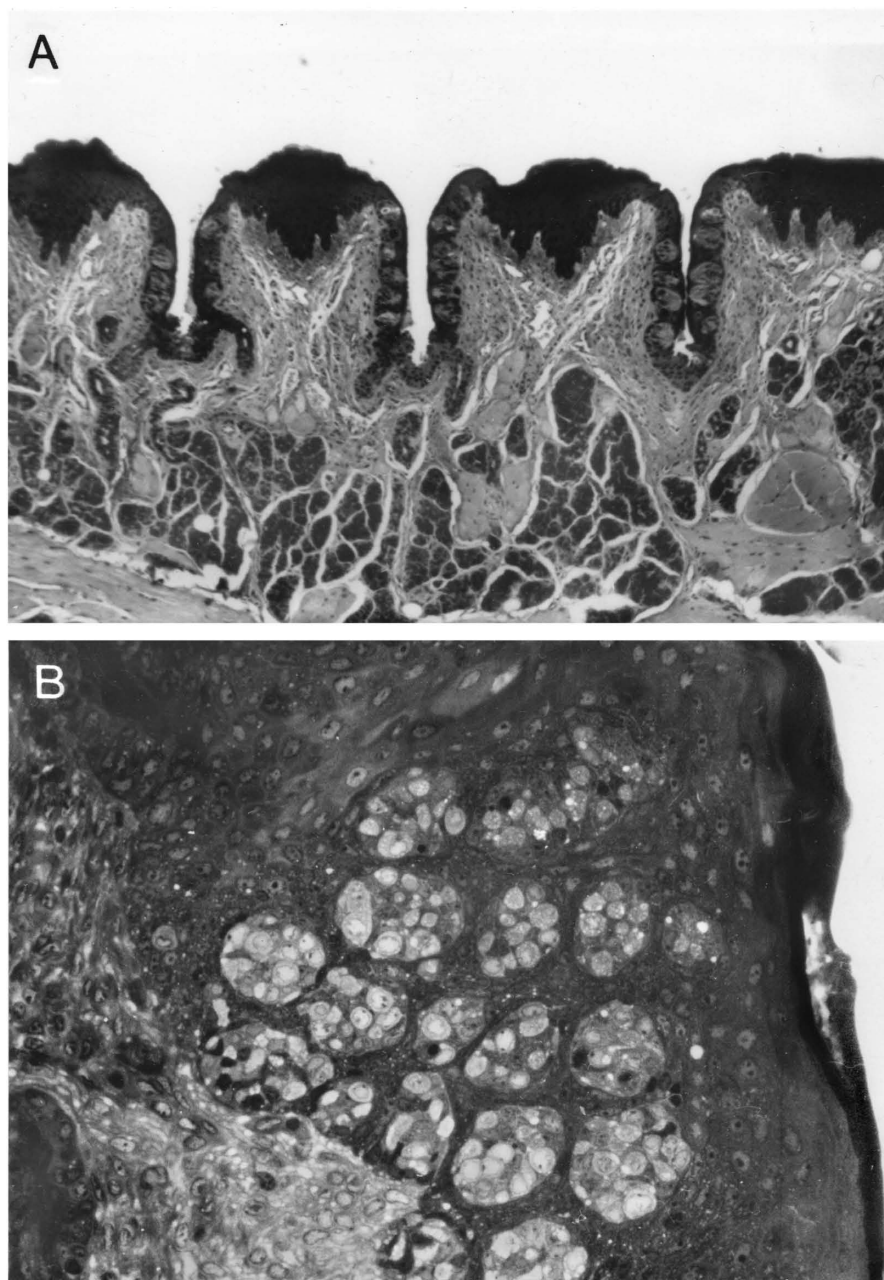


Рисунок 10. Листовидный вкусовой сосочек: а) срез в горизонтальной и б) во фронтальной плоскости сечения тела животного.

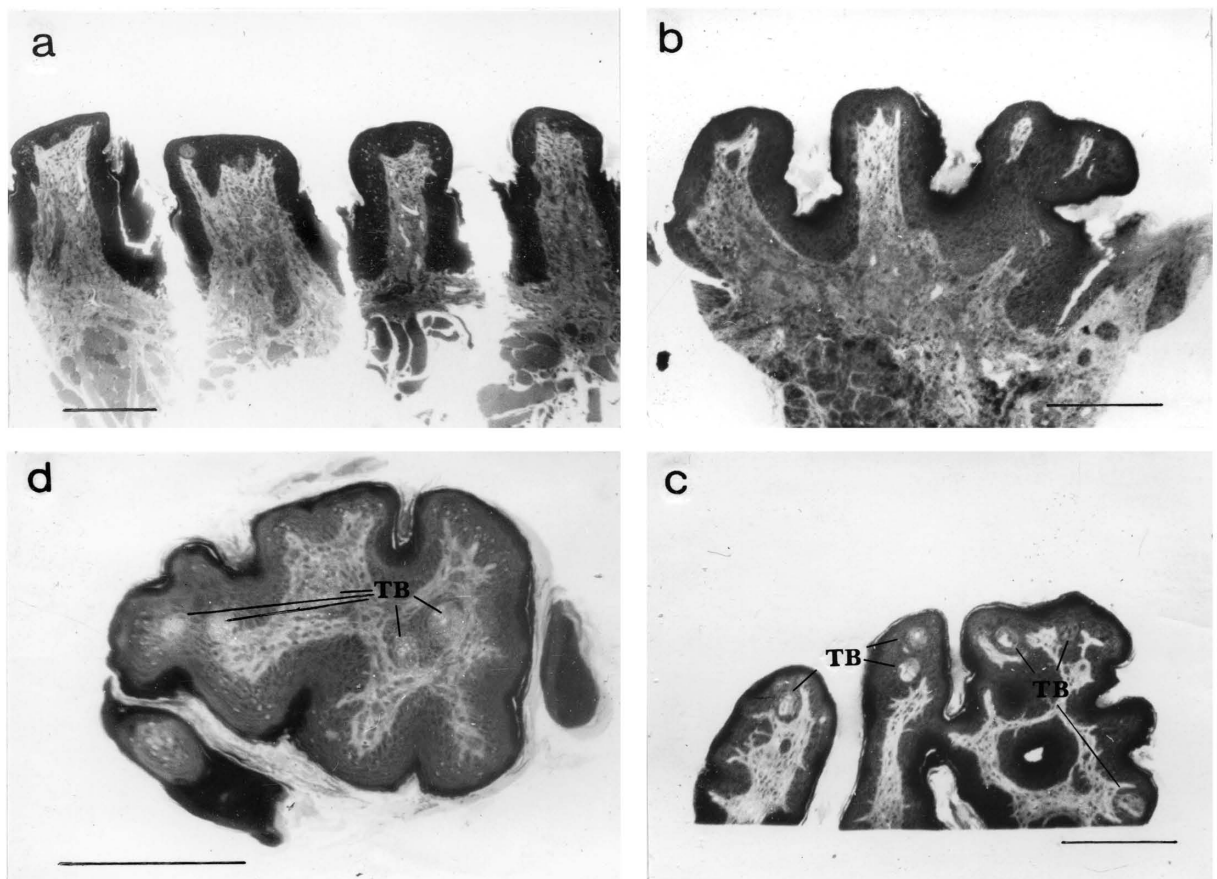


Рисунок 11. Грибовидные сосочки: а) изолированные; б) переходная форма вкусового сосочка между грибовидными и желобоватыми, срез во фронтальной плоскости сечения тела животного; с) грибовидный сосочек с несколькими вкусовыми почками, срез в горизонтальной плоскости сечения. Шкала= 200 μm .

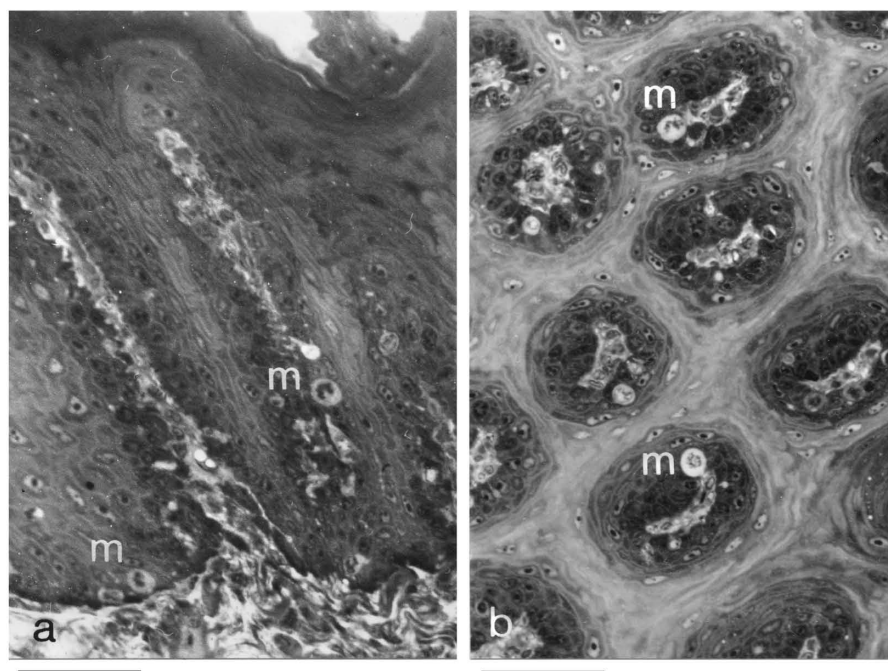


Рисунок 12. «Метафазные» клетки в базальном слое эпителия языка гибернирующего суслика: а) срез через нитевидные сосочки в медиальной и б) в горизонтальной плоскости. Шкала= 50 μ m.

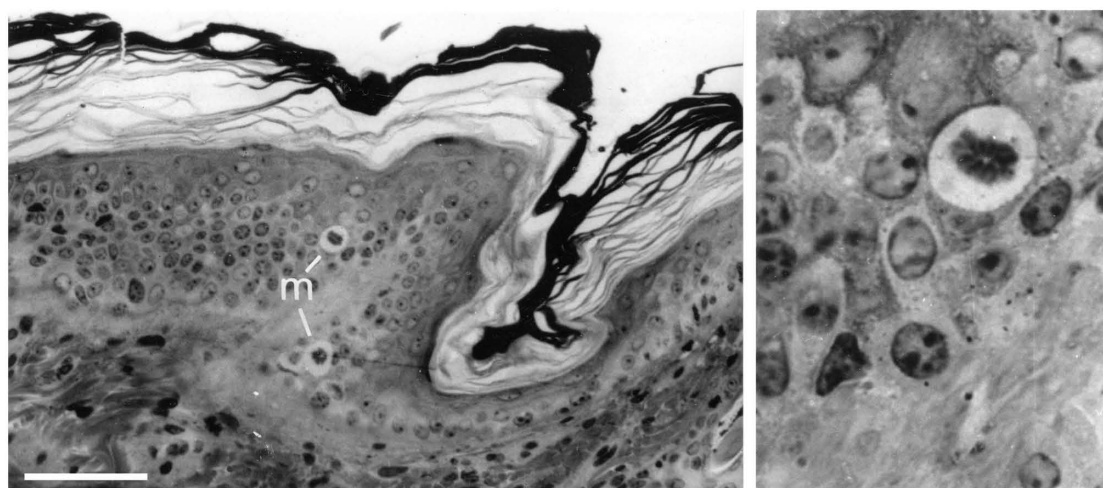


Рисунок 13. «Метафазные» клетки в базальном слое эпителия кожи гибернирующего суслика. Шкала= 50 μ m.

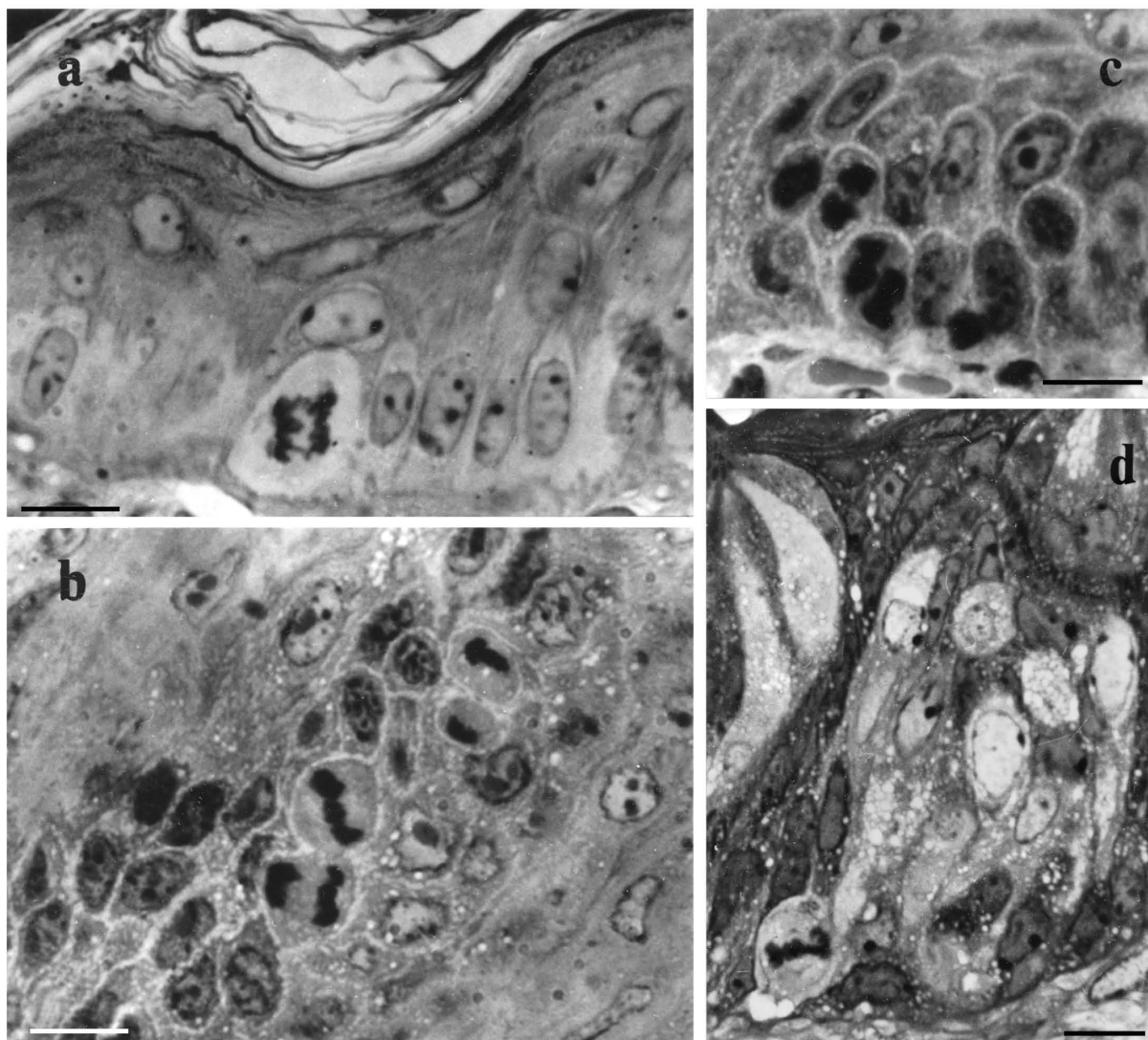


Рисунок 14. Типичные фигуры митоза у суслика в нормотермном состоянии. а) анафаза в эпителии кожи; б-с) метафаза, анафаза и телофаза в базальном слое эпителия языка; д) метафаза во вкусовой почке желобоватого сосочка. Хромосомы в метафазных клетках собраны веретеном деления в экваториальной плоскости клетки. Шкала= 10 μm .

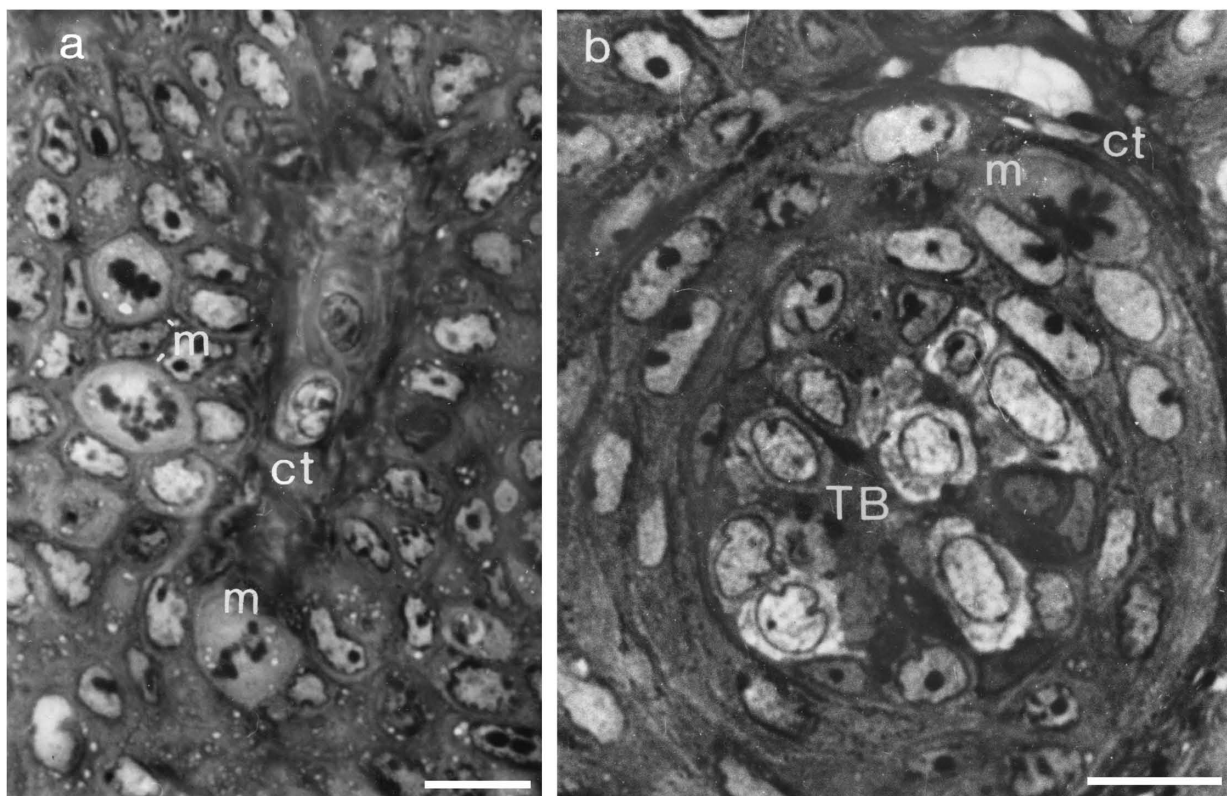


Рисунок 15. «Метафазные» клетки в базальном слое эпителия языка охлаждённой крысы. Срезы в горизонтальной плоскости а) через нитевидный сосочек и б) через грибовидный сосочек. Шкала= 10 μm .

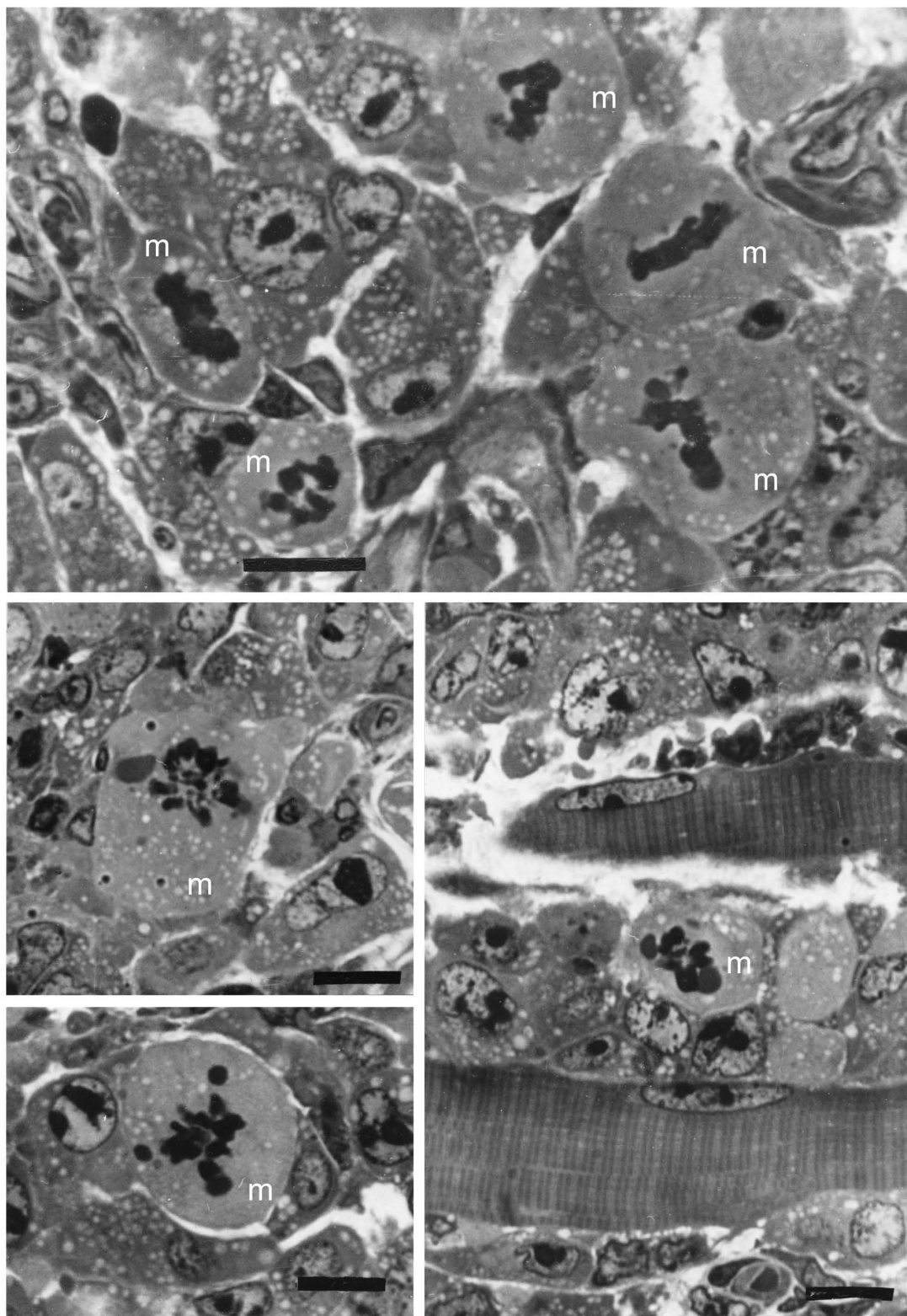


Рисунок 16. «Метафазные» клетки солидной аденокарциномы Эрлиха у охлаждённых мышей. Шкала= 10 μ m.

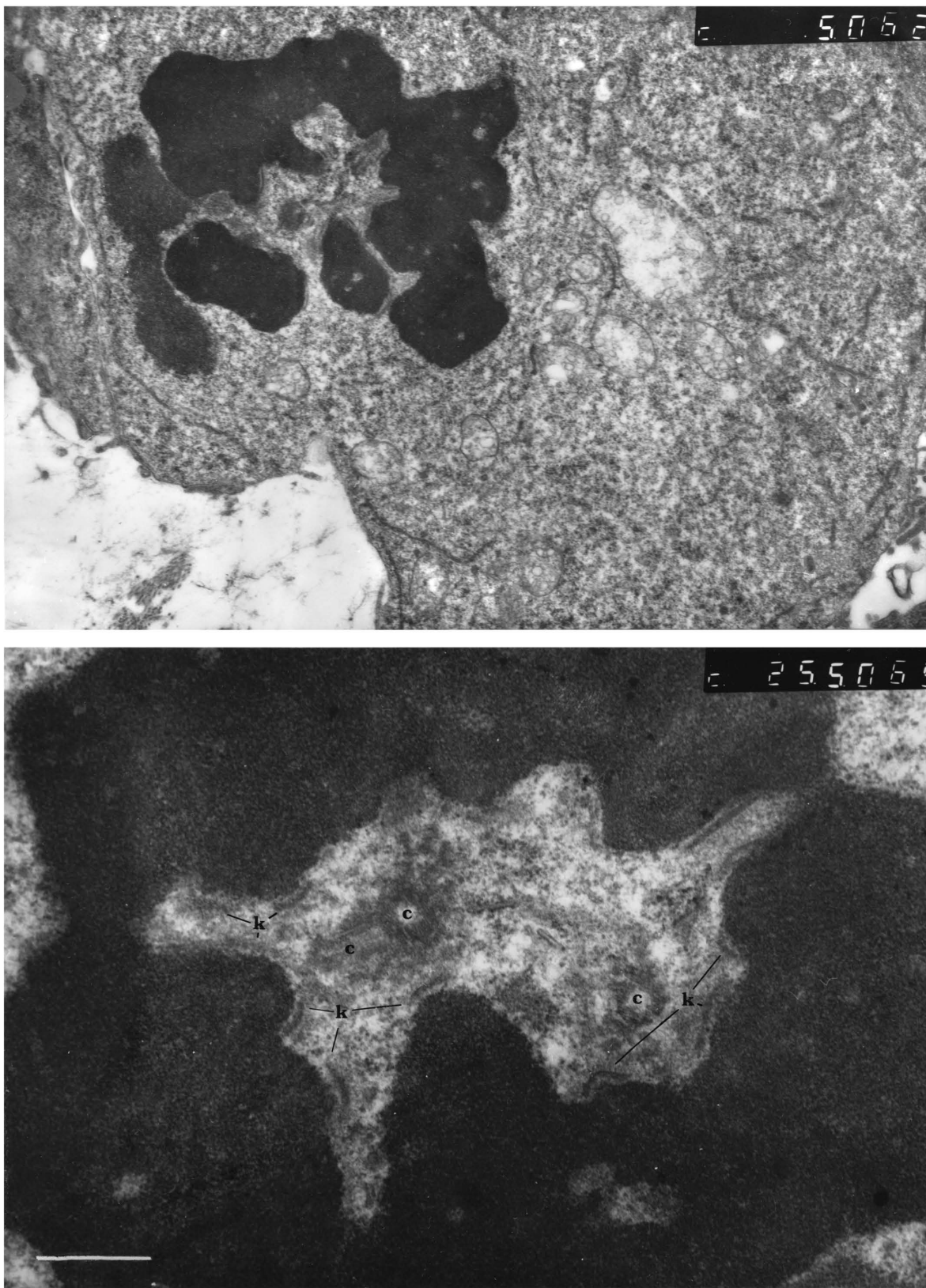


Рисунок 17. Ультраструктура «метафазных» клеток солидной аденокарциномы Эрлиха у охлаждённых мышей. Шкала= 500 nm.

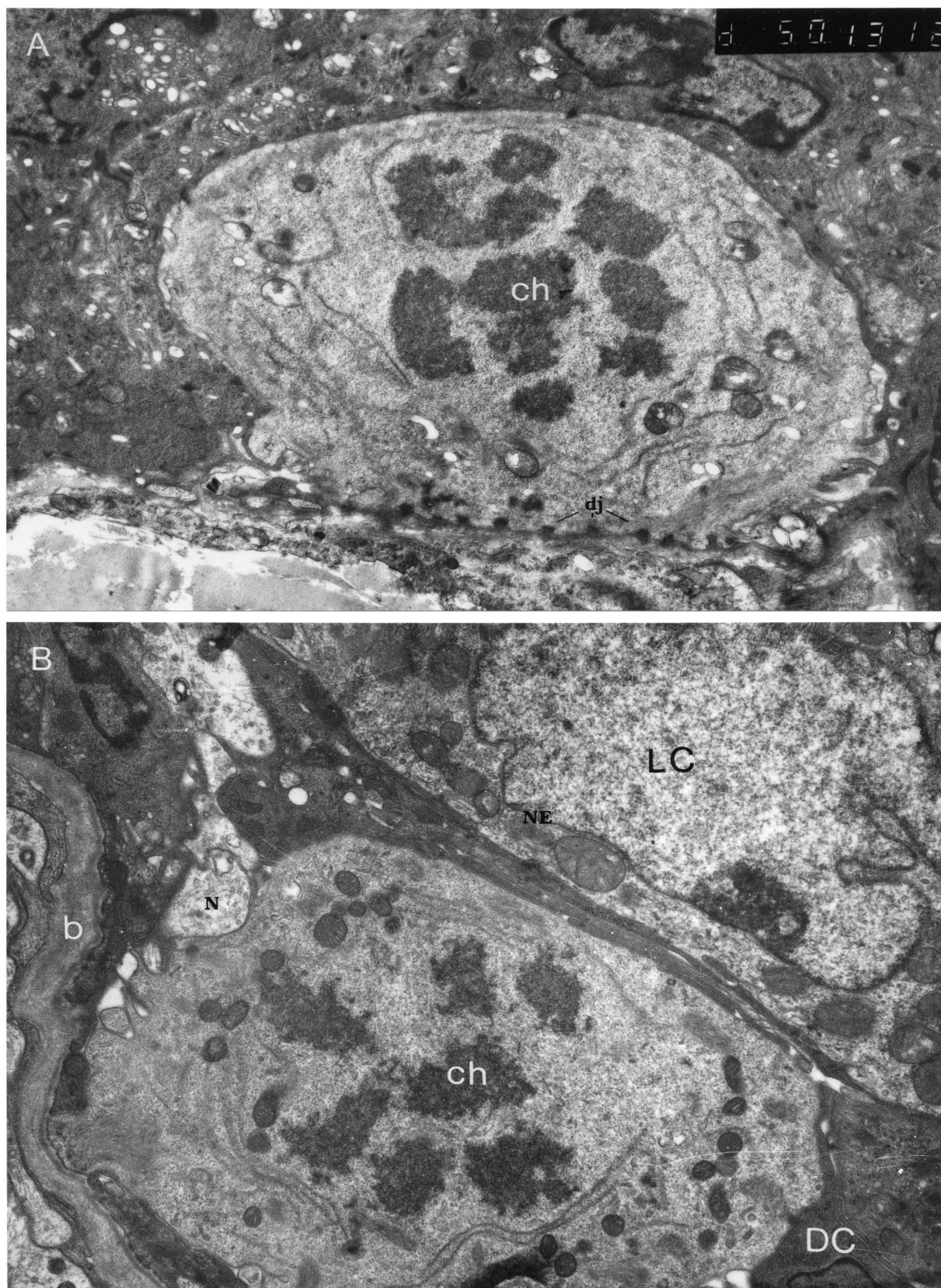


Рисунок 18. Ультраструктура «метафазных» клеток гибернирующего суслика
а) в базальном слое эпителия языка и б) во вкусовой почке.

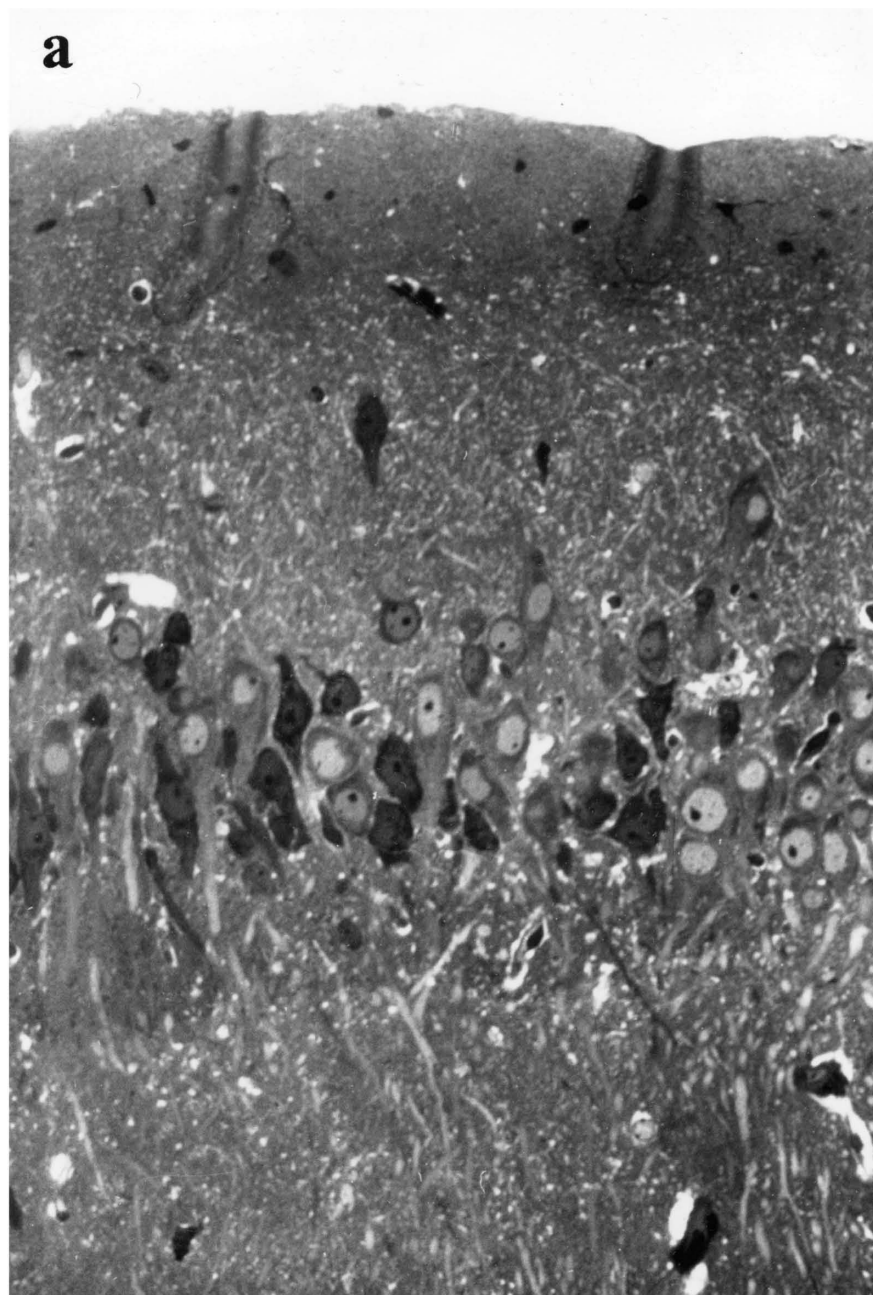


Рисунок 19. а) «светлые» и «темные» гиппокампальные пирамидные нейроны поля СА3 у крысы. Температурой мозга 20,5°C.

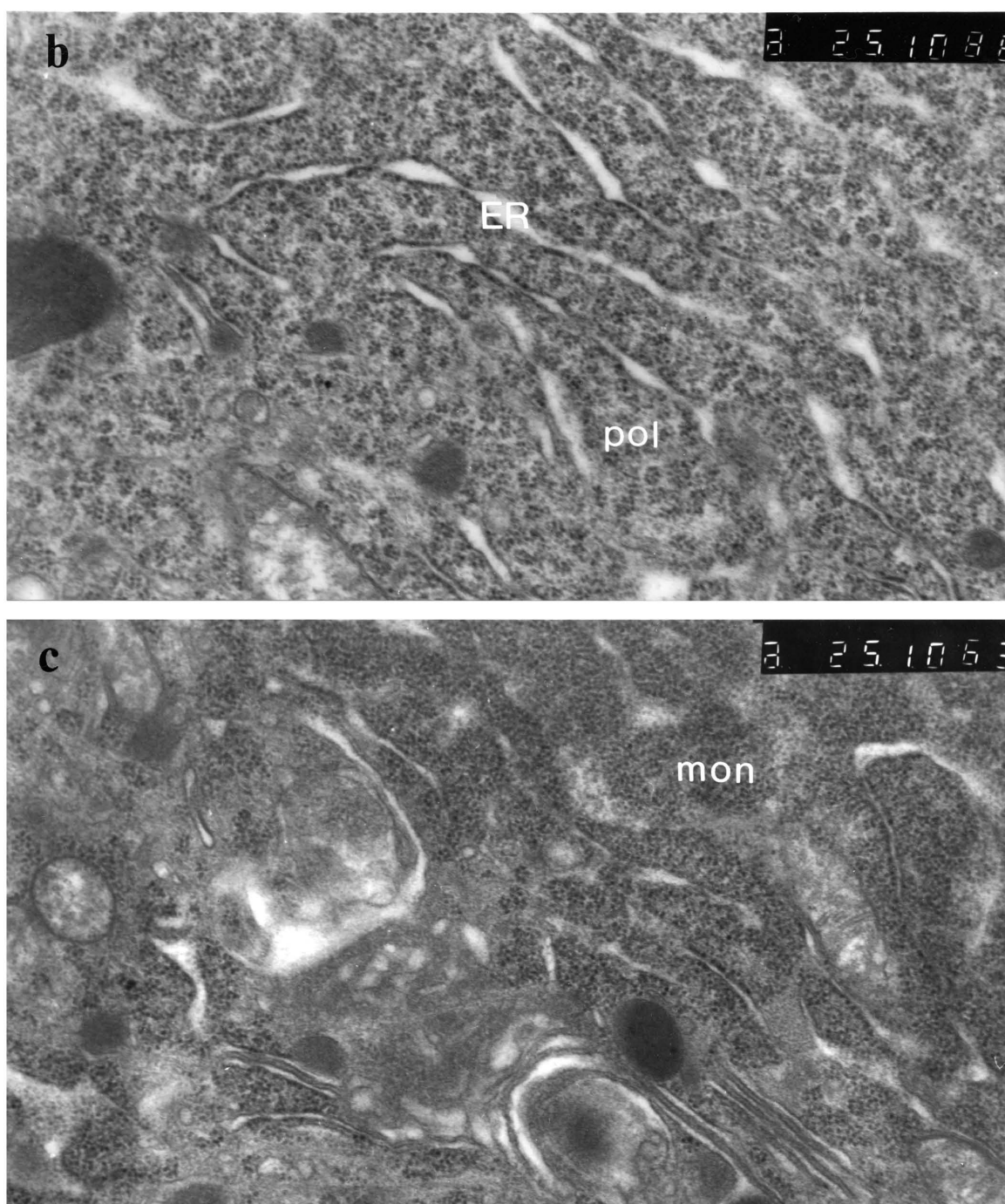


Рисунок 19 (продолжение). b) «светлые» и c) «темные» гиппокампальные пирамидные нейроны поля СА3 у крысы. Температурой мозга 20,5°C. В «светлых» нейронах большинство рибосом представлено свободными полисомами.

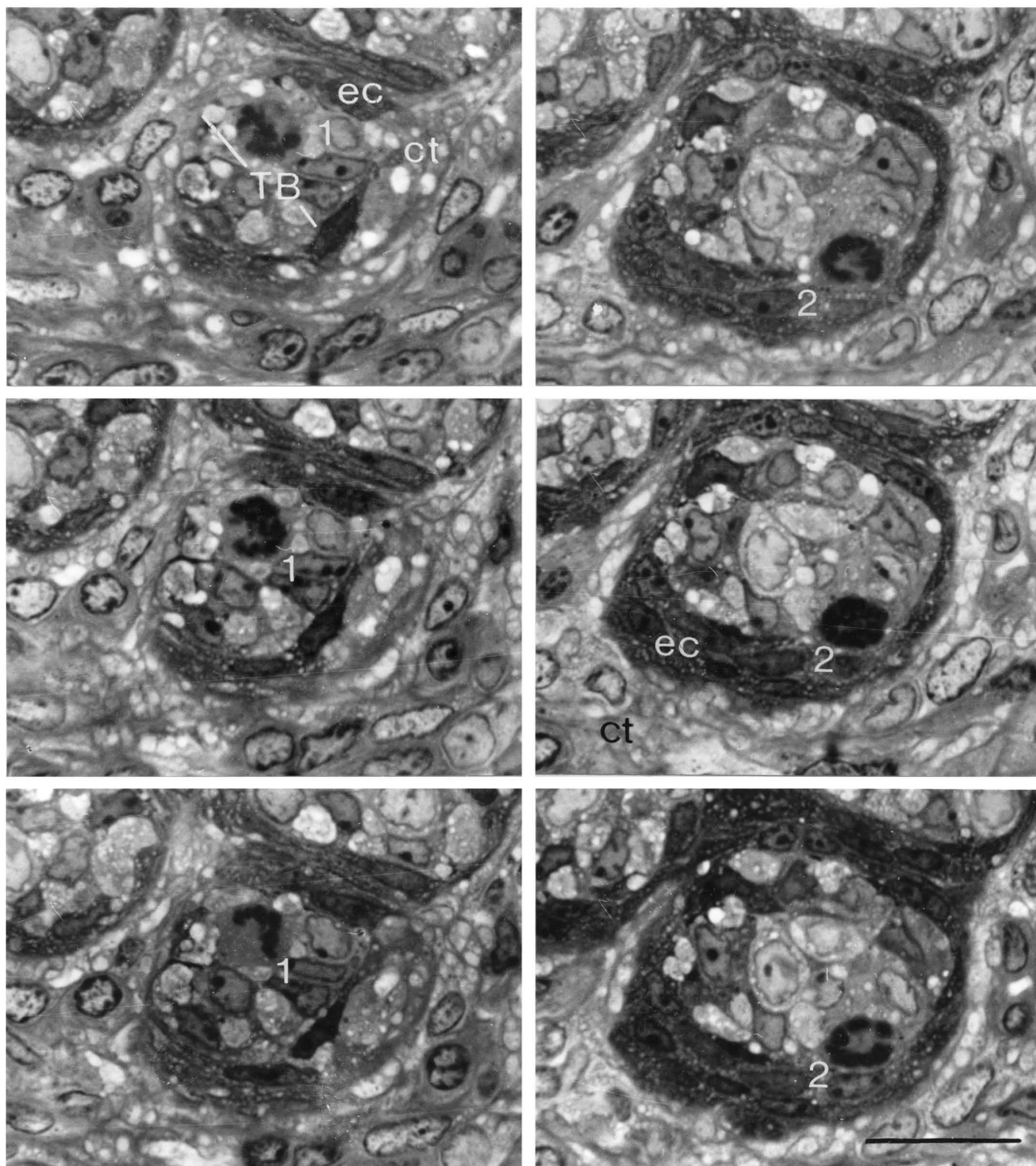


Рисунок 20. Базальные (стволовые) клетки во вкусовой почке. На срезах через снование вкусовой почки можно видеть, что 2 митотически активные клетки располагаются раздельно, на противоположных сторонах вкусовой почки. Шкала= 20 μ m.

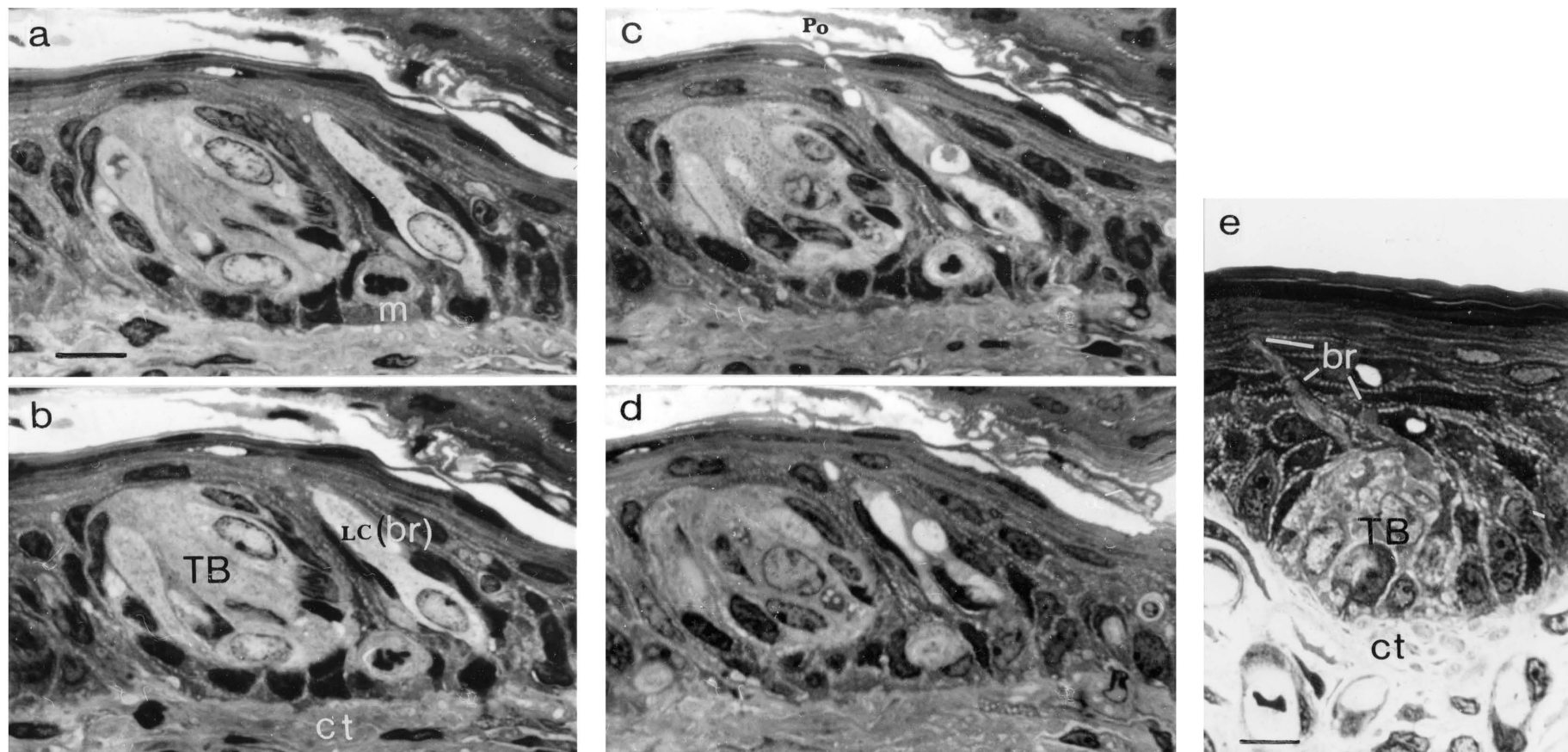


Рисунок 21. Ответвления вкусовых клеток от вкусовой почки у суслика:
 а-д) ответвляющиеся клетки образуют вкусовую пору (листовидный сосочек);
 е) вкусовая почка имеет несколько ответвлений (грибовидный сосочек). Шкала= 10 μm .

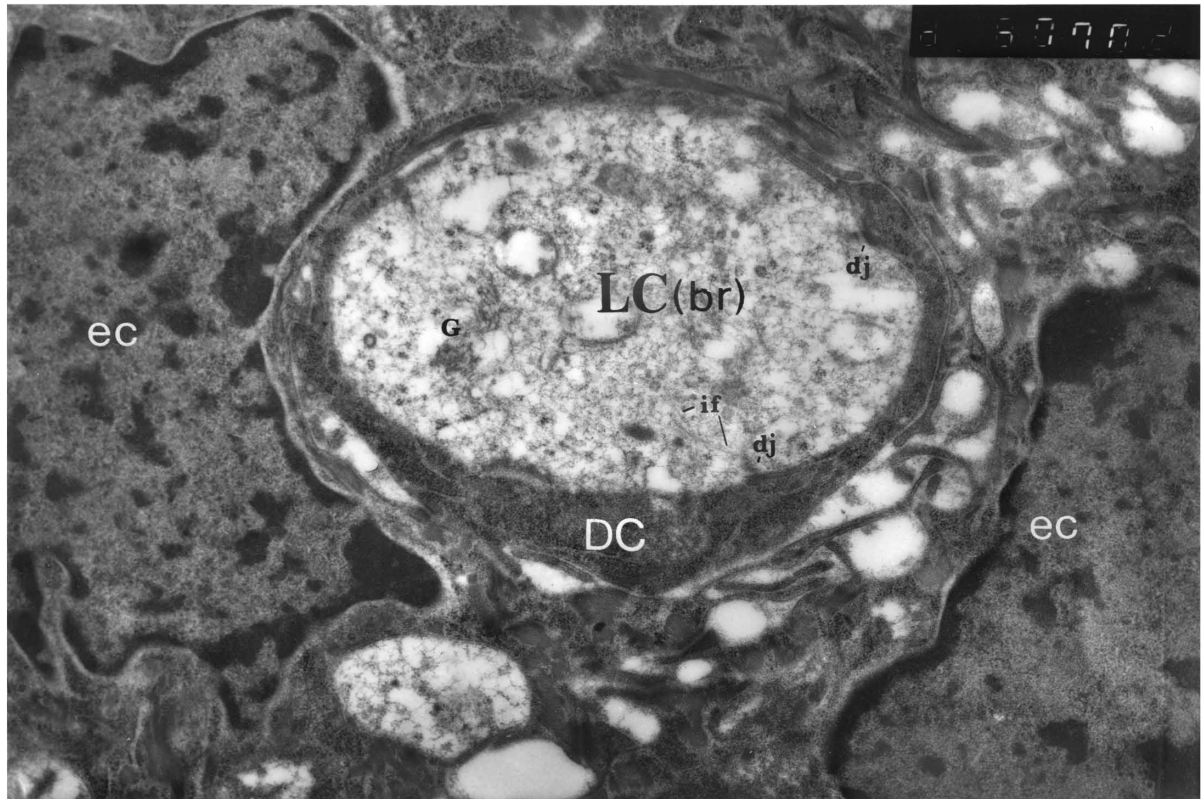


Рисунок 22. Поперечный срез через ответвляющуюся вкусовую клетку от вкусовой почки. Тёмная клетка тип-I обхватывает, изолируя, светлую клетку тип-III.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что в процессе гибернации *C.undulatus* клеткам различных тканей организма свойственны обратимые и повторные структурно-функциональные температурозависимые изменения в белок-синтезирующем аппарате, что выявляется в обратимой сборке и разборке свободных и мембран-связанных полирибосом.

2. На основании стереологического анализа показано, что вход сусликов в холодное оцепенение сопровождается обратимой остановкой и накоплением клеток в метафазе в активно пролиферирующих тканях (эпителии, раковые клетки, костный мозг и вкусовые клетки). Сравнительный анализ этих же тканей у негиберирующих животных (мышей и крыс) после охлаждения их тела до 17-18°C также выявил накопление метафазных клеток. Электронно-микроскопически показано, что механизм холодной остановки клеток в метафазе происходит за счет обратимой разборки микротрубочек.

3. Предложен метод оценки числа стволовых клеток в активно пролиферирующих тканях млекопитающих путем их охлаждения и подсчета метафазных клеток.

4. Установлено, что цикличность процесса зимней спячки у суслика сопровождается синхронизацией и накоплением митотически делящихся клеток в различных эпителиальных тканях.

5. На основании сравнительного стереологического анализа как гибернирующих сусликов, так и охлажденных мышей и крыс показано, что задержка стволовых клеток в метафазе не требует специального изменения гормонального статуса организма и проявляется в прямом цитостатическом эффекте охлаждения тела животного. Механизм задержки митотических клеток в метафазе является универсальным для всех пролиферирующих тканей теплокровных животных, включая опухолевые.

6. Обнаруженные эффекты холодной синхронизации клеток позволили установить, что вкусовые почки содержат не более 2-х стволовых клеток, которые могут быть предшественниками двух независимых линий вкусовых клеток.

ЦИТИРУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Барышникова Л.В. Ультраструктура вкусовых клеток в зависимости от их функционального состояния на примере зимней спячки якутского длиннохвостого суслика *Citellus undulatus*. Магистерская диссертация. Пущино, 1998.
2. Игнатьев Д. А., Сухова Г. С., Сухов В. П. Зависимость скорости частоты сердцебиения длиннохвостого якутского суслика от окружающей температуры. Журнал эволюционной биохимии и физиологии 1992., 28 (5), 582.
3. Игнатьев Д.А., Воробьев В.В. Сухова Г.С, Зиганшин Р.Х, Сухов В.П., Темнов А.В., Темнов А.А, Ашмарин И.П. Зимняя спячка и искусственный гипобиоз (изучение нейрохимических факторов гибернации) Нейрохимия Том 15, вып. 3, 1998.
4. Козловская Л.В., Мартынова М.А. Учебное пособие по клиническим лабораторным методам исследования. М. "Медицина", 1975.
5. Попов В.И., Новосёлов В.И., Хуцян С.С., Новиков В.В., Фесенко Е.Е. Ноет (1990) Цитология, 32(11), с.1090-1093.
6. Рогачевский В.В., Игнатьев Д.А., Кузьминых С.Б., Хуцян С.С., Попов В.И. Обратимые изменения в структурно-функциональной организации вкусовых и эпителиальных клеток языка у гибернирующих сусликов. Тезисы докладов III открытой научной конференции молодых учёных. Пущино, 1998.
7. Франкфурт О.С. Клеточный цикл в опухолях. М., Медицина, 1975.
8. Штарк М.Б. Мозг зимнеспящих. Наука. Сибирское отд., 1970 – 240 с.
9. Arvidson K., Cottler-Fox M., and Friberg U. 1981a. Taste buds of the fungiform papillae in Cynomolgus monkey. J. Anat., 133, 271.
10. Arvidson K., Cottler-Fox M., and Friberg U. 1981b. Fine structure of taste buds in the human fungiform papilla. Scand. J. Dent. Res., 89, 297.
11. Bannister L. H. 1974. Possible functions of mucus at gustatory and olfactory systems. In: Transduction Mechanism in Chemoreception (Poynder T. M., ed.), Information Retrieval, London, 39.

12. Beidler L. M. and Smallman R. L. 1965. Renewal of cells within taste buds. J. Cell Biol., 27, 263.
13. Bo, X., Alavi, A., Xiang, Z., Oglesby, I., Ford, A. and Burnstock, G. Localization of ATP-gated P2X2 and P2X3 receptor immunoreactive nerves in rat taste buds. Neuroreport 10: 1107-11, 1999.
14. Boucher B, Norman C.S. Cold synchronization for the study of peripheral blood and bone marrow chromosomes in leukemias and other hematologic disease states. Hum Genet 1980;54(2):207-11.
15. Bradley, R.M. Tongue Topography. In: Handbook of Sensory Physiology, edited by L. M. Beidler. Heidelberg: Springer, 1971, vol. IV Chemical Senses, Part 2, Taste, p. 1-30.
16. Brouwer J. N. and Wiersma A. 1978. Location of taste buds in intact taste papillae by a selective staining method. Histochemistry, 58, 145.
17. Bruce Alberts, Dennis Bray, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, James D. Watson. Molecular Biology of the Cell. THIRD EDITION. Garland Publishing, Inc. New York London.
18. Caggiano M., J.S. Kauer, D.D. Hunter. Globose basal cells are neuronal progenitors in the olfactory epithelium: a lineage analysis using replication-incompetent retrovirus. Neuron 13: 339-352, 1994.
19. Cameron I.L., Thrasher G.D (eds). Cellular and molecular renewal in the mammalian body. New York – London, 1971.
20. Coggeshall, R.E., Lekan, H.A. Methods for determining numbers of cells and synapses: a case for more uniform standards of review. J Comp Neurol. 1996 Jan 1;364(1):6-15. Review.
21. Delay R. J., Kinnamon J. C., and Roper S. D. 1986. Ultrastructure of mouse vallate taste buds. II. Cell types and cell lineage. J. Comp. Neurol., 253, 242.
22. Demeneix, B.A., Henderson N.E., 1978a. Serum T4 and T3 in active and torpid ground squirrels, *Spermophilus richardsoni*. Gen.Comp.Endocrinol. 35, 77-85.
23. Demeneix, B.A., Henderson N.E., 1978b. Thyroxine metabolism in active and torpid ground squirrels Gen.Comp.Endocrinol. 35, 86-92.

24. Dougbag A. E.-S. 1987. Scanning electron microscopic studies on the morphogenesis of the lingual gustatory papillae of camel (*Camel dromedarius*). I. Morphogenesis of the fungiform papillae. *Z. Mikrosk.-Anat. Forsch. (Leipzig)*, 101, 881.
25. Dym M. Spermatogonial stem cells of the testis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11287—11289, 1994.
26. Engstrom H. and Rytzn C. 1956. The fine structure of taste buds and taste fibers. *Ann. Otol. (St. Louis)*, 65, 361.
27. Farbman A. I., Ogden-Ogle C. K., Hellekant G., Simmons S. R., Albrecht R. M., and Van der Wel H. 1987. Labeling of sweet taste binding sites using a colloidal gold-labeled sweet protein, thaumatin. *Scanning Microscopy*, 1, 351.
28. Farbman A.I. Renewal of taste bud cells in rat circumvallate papillae. *Cell Tissue Kinet.* 1980, Jul; 13(4):349-57.
29. Farbman AI, Mbiene JP Early development and innervation of taste bud-bearing papillae on the rat tongue. *J Comp Neurol* 1991 Feb 8;304(2):172-86.
30. Finger T. E. 1985. Peptide immunohistochemistry demonstrates multiple classes of perigemmal nerve fibers in the circumvallate papilla of the rat. *Chem. Senses*, 11, 135.
31. Finger T. E., Womble M., Kinnamon J. C., and Ueda T. 1990. Synapsin I-like immunoreactivity in nerve fibers associated with lingual taste buds of the rat. *J. Comp. Neurol.*, 292, 283.
32. Florant, G.L., and Weitzman, E.G.(1980). Diurnal and episodic pattern of plasma cortisol during fall and spring in young and old woodchucks (*Marmota monax*). *Comp.Biochem.Physiol.A* 66A, 575-581.
33. Florant, G.L.1981. Plasma cortisol and catecholamine concentration in euthermic and hibernating woodchucks (*Marmota monax*). *Cryobiology* 18,95.
34. Gordon et al., 1998
35. Hou. L.-T.. Hettinger, T.P. and Frank, M.E., Innervation and structure of taste buds in hamsters following unilateral chorda tympani neurectomy, *Chem. Senses Flavor*, 10 (1985) 444.

36. Humphrey C.D., Pittman F.E. A simple methylene blue-azure II-basic fuchsin stain for epoxy-embedded tissue sections. *Stain Technol* 1974 Jan;49(1):9-14
37. Jan-Mark Geusebroek, Arnold W.M. Smeulders Frans Cornelissen and Hugo Geerts. Segmentation of Tissue Architecture by Distance Graph Matching *Cytometry* 35:11-22(1999).
38. Kinnamon J. C., Sherman T. A., and Roper S. D. 1988. Ultrastructure of mouse vallate taste buds. Patterns of synaptic connectivity. *J. Comp. Neurol.*, 270, 1.
39. Kinnamon J. C., Taylor B. J., Delay R. J., and Roper S. D. 1985. Ultrastructure of mouse vallate taste buds. Taste cells and their associated synapses. *J. Comp. Neurol.*, 235, 48.
40. Kobayashi N., Mundel P. 1988 *Cell Tissue Res.* 291:163-174.
41. Kruman I.I. Comparative analysis of cell replacement in hibernators. *Comp Biochem Physiol A* 1992;101(1):11-8.
42. Kruman I.I., E.N. Ilyasova, S.A. Rudchenko, Z.S. Khurkhulu. The intestinal epithelial cells of ground squirrel (*Citellus undulatus*) accumulate at G₂ phase of the cell cycle throughout a bout of hibernation. *Comp. Biochem. Physiol. A* 90(2): 233-236, 1988.
43. Lesser B., T.P. Brent. Cold storage as a method for accumulating mitotic HeLa cells without impairing subsequent synchronous growth. *Exp. Cell Res.* 62(2-3): 470-473, 1970.
44. Lindemann B. 1996. Taste Reception. *Physiological Reviews*, 120, 719.
45. MacKenzie, I.C. Ordered structure of the stratum corneum of mammalian skin. *Nature*, 222, 881-882, 1969.
46. McEwen BF, Hsieh CE, Mattheyses AL, Rieder CL A new look at kinetochore structure in vertebrate somatic cells using high-pressure freezing and freeze substitution. *Chromosoma* 1998 Dec;107(6-7):366-75.
47. Miller I.J., Smith D.V. Quantitative taste bud distribution in the hamster. *Physiology & Behavior* 1984, Vol.32, pp.275-285.
48. Monti-Graziadei G.A., P.P.C. Graziadei. Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. II. Degeneration and reconstitution of the olfactory sensory neurons after axotomy. *J. Neurocytol.* 8: 187-213, 1979.

49. Morrison, S.J., N.M.Shah, D.J. Anderson. Regulatory Mechanisms in Stem Cell Biology. *Cell* 88: 287-298, 1998.
50. Murray R. G. 1986. The mammalian taste bud type III cell: a critical analysis. *J. Ultrastr. Mol. Structr. Res.*, 95, 175.
51. Murray R. G. and Murray A. 1960. The fine structure of taste buds of Rhesus and Cynomaligus monkeys. *Anat. Res.*, 138, 211.
52. Murray R. G. and Murray A. 1970. The anatomy and ultrastructure of taste endings, in *Taste and Smell in Vertebrates* (Wolstenholme G. E. W. and Knight J., eds.), J. & A. Churchill, London, p. 3.
53. Murray R. G. and Murray A. 1971. Relations and possible significance of taste bud cells. In: *Contributions to Sensory Physiology* (Neff W. D., ed.), Vol. 5, Academic Press, New York, p. 47.
54. Murray R. G. and Murray A., and Fujimoto S. 1969. Fine structure of gustatory cells in rabbit taste buds. *J. Ultrastr. Res.*, 27, 444.
55. Nada O. and Hirata K. 1975. The occurence of the cell type containing a specific monoamine in the taste buds of rabbit's foliate papillae. *Acta Anat.*, 135, 365.
56. Nemetschek-Gansler H. and Ferner H. 1964. Uber die Ultrastruktur der Geschmacksknospen. *Z. Zellforsch.*, 63, 155.
57. Ohmura S., Horimoto S., and Fujita K. 1989. Lectin cytochemistry of the dark granules in the type I cells of syrian hamster circumvallate tastebuds. *Arch. Oral Biol.*, 34, 161.
58. Potten C.S. The epidermal proliferative unit: the possible role of the central basal cell. *Cell Tissue Kinet* 1974 Jan;7(1):77-88.
59. Potten C.S., M. Loeffler. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 110: 1001-1020, 1990.
60. Reutter K. and Klessen C. 1979. Verleichend-kohlenhydrathistochemische Untersuchung der Geschmacksknospen niederer und hoherer Wirbeltiere. *Verh. Anat. Ges.*, 73, 1019.
61. Reutter, K., and M. Witt. Morphology of Vertebrate Taste Organs and Their Nerve Supply. In: *Mechanisms of Taste Transduction*, edited by S. A.Simon and S. D. Roper. Boca Raton: CRC Press, 1993, vol. p. 29-82.

62. Scalzi H. A. 1967. The cytoarchitecture of gustatory receptors from the rabbit foliate papillae. *Z. Zellforsch.*, 80, 413.
63. Sloan. H.E., Hughes. S.E. and Oakley, B. Chronic impairment of axonal transport eliminates taste responses and taste buds. *J. Neurosci.*, 3(1983)117-123.
64. Stewart, T.A., Mintz B. 1981. Successive generations of mice produced from an established culture line of euploid teratocarcinoma cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 78,6314-6318.
65. Takeda M. and Kitao K. 1980. Effect of monoamines on the taste buds in the mouse. *Cell Tissue Res.*, 210, 71.
66. Toyoshima K. and Tandler B. 1987. Modified smooth endoplasmic reticulum in type II cells of rabbit taste buds. *J. Submicrosc. Cytol.*, 19, 85.
67. Trujillo-Cenos O. 1957. Electron microscope study of the rabbit gustatory bud. *Z. Zellforsch.*, 46, 272.
68. Vinogradova M.S. Annual cycle of the changes in the mitotic activity of gastric mucosal epithelium in hibernating rodents. *Biull Eksp Biol Med.* 1982 May; 93(5):91-3.
69. Vinogradova M.S. Mitotic activity of stomach epithelium in the ground squirrel, *Citellus erythrogenys* Brandt. *Comp. Biochem. Physiol. A* 91(2):235-239, 1988.
70. Wang, L.C.H. Hibernation and the Endocrines. In: *Hibernation and Torpor in Mammals and Birds.* edited by Charles P. Lyman, New York, ACADEMIC PRESS, 1982.
71. Wenberg, G.M., and Holland, J.C.(1973a). The circannual variations of thyroid activity in the woodchuck (*Marmota monax*). *Comp.Biochem.Physiol. A* 44A, 775-780.
72. West, M.J. Techniques Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: issues of precision and bias. *Trends in Neuroscience* 1999, 22:51-61.
73. Whitehead M.C., Beeman. C.S. and Kinsella. B.A., Distribution of taste and general sensory nerve endings in fungiform papillae of the hamster. *Am. J. Anat.*, 173 (1985) 185-201.

74. Whitehead M. C., Frank M. E., Hettinger T. P., Hou L.-T., and Nah H.-D. 1987. Persistence of taste buds in denervated fungiform papillae. *Brain Research*. 405, 192.
75. Witt M. and Reutter K. 1988. Lectin histochemistry on mucous substances of the taste buds and adjacent epithelia of different vertebrates. *Histochemistry*, 88, 453.
76. Yoshie S., Wakasugi C., Teraki Y., Iwanaga T., and Fujita T. 1988. Immunocytochemical localizations of neuron-specific proteins in the taste bud of the guinea pig. *Arch. Histol. Cytol.*, 54, 113.
77. Young, R.A., Danforth, E.Jr., Vagenakis, A.G., Rupp, P.P., Frink, R., and Sims, E.A.N. (1979b). Seasonal variations and the influence of body temperature on plasma concentrations and binding of thyroxine and triiodothyronine in the woodchuck. *Endocrinology* 104, 996-999.