

УДК 576/3;576/5;576/7

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРОГРАММИРУЕМОЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ И ПРОЛИФЕРАЦИИ ГЕПАТОЦИТОВ В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ КУР-БРОЙЛЕРОВ

Хамитова Л.Е.

ФГБОУ ВПО Омский Государственный Педагогический Университет, Омск, Россия (644099 Россия, г. Омск, наб. Тухачевского, 14) sagalbaeva@mail.ru

Настоящая статья посвящена изучению механизмов поддержания тканевого гомеостаза печени в период эмбрионального развития кур-бройлеров четырехлинейного кросса «РОСС-308». Промышленное разведение оказывает стрессирующее действие на организм птиц и на печень, в частности. Нами выявлено, что тканевый гомеостаз обеспечивается динамическим балансом между погибшими гепатоцитами по пути апоптоза на фоне высоких показателей экспрессии белка p-53 и bcl-2, а также числа двуядерных и PCNA-позитивных гепатоцитов в области портального тракта и централобулярной зоны ацинуса. В области центральных вен гепатоциты погибают в большей мере по пути аутофагии на фоне низких показателей экспрессии гепатоцитами белка p-53 и bcl-2 и большого числа двуядерных форм гепатоцитов. Согласно показателям цитофотометрии на раннюю стадию эмбриогенеза выявленное большое количество гиподиплоидных гепатоцитов - 2%, морфологически проявляется в большом количестве изолированных участков гетерохроматина, вместе с тем 84% гепатоцитов находятся в стадии G₀/G₁ и 14% в активных фазах цикла пролиферации и полиплоидизации (S+G₂+M).

Ключевые слова: тканевой гомеостаз, морфогенез, пути программируемой клеточной гибели, пролиферация, критические периоды развития, птицы, эмбриогенез, печень, гепатоциты, p-53, PCNA, bcl-2, апоптоз, аутофагия.

COMPARATIVE DYNAMICS OF THE INDICATORS OF PROGRAMMED CELL DEATH AND HEPATOCYTE PROLIFERATION IN BROILER CHICKEN EMBRYOGENESIS

Khamitova L.E.

Omsk State Pedagogical University, Omsk, Russia (Russia 644099, Omsk, Tukhachevsky levee, 14) sagalbaeva@mail.ru

This article is devoted to the study of mechanisms for maintenance of liver tissue homeostasis in embryonic development of broiler chickens of four-linear cross "ROSS-308". Industrial breeding has stressful effect on the organism and particularly on the liver of birds. We have found that tissue homeostasis is based on a dynamic balance between the dead hepatocytes that have gone through apoptosis at the high expression of the protein p-53 and bcl-2 and the number of binuclear and PCNA-positive hepatocytes in the area of portal tract and central lobular zone of the acinus. In the area of central veins, hepatocytes mostly undergo autophagy at the low expression of proteins p-53 and bcl-2 in hepatocytes and a large number of binuclear forms of hepatocytes. According to cytophotometric data at the early stage of embryogenesis revealed large number of hypodiploid hepatocytes - 2% is morphologically manifested as a large number of isolated areas of heterochromatin. At the same time, 84% of the hepatocytes are in G₀/G₁ stage and 14% are in the active phases of the proliferation and polyploidization cycle (S + G₂ + M).

Keywords: tissue homeostasis, morphogenesis, pathways of programmed cell death, proliferation, critical periods of development, the birds, embryogenesis, liver, hepatocytes, p-53, PCNA, bcl-2, apoptosis, autophagy.

Фундаментальным понятием в биологии является понятие о гомеостазе. Особую актуальность приобретает исследования механизмов поддержания тканевого гомеостаза организма в условиях интенсивной урбанизации окружающей среды и представляет собой центральную проблему биологии и медицины. При этом актуальным является изучение развития органов, которые непосредственно участвуют в поддержании гомеостаза организма [1; 6]. Печень, как один из таких органов, осуществляет межсистемную кооперацию в

организме, а сложность структуры, полифункциональность, быстрота вовлечения в деструктивные и репаративные процессы – определяет интерес исследователей к сравнительному изучению закономерностей структурно-функциональной организации печени, анализу адаптационных перестроек, выявлению механизмов, обеспечивающих развитие организма в целом. Исследование процессов морфогенеза печени на различных критических периодах эмбриогенеза ведет к пониманию степени зрелости и функциональных возможностей органов и организма птиц эволюция которых контролируется человеком и проходила в разных направлениях, вследствие чего было получено огромное количество разнообразных форм – кросс-линий кур [7].

В связи с этим **целью** нашей работы является изучить соотношение путей программируемой клеточной гибели, регуляторов клеточного цикла и показателей пролиферации гепатоцитов в трех зонах печеночного ацинуса печени кур-бройлеров «РОСС-308» в раннем эмбриогенезе.

Материалы и методы. Для решения поставленных задач эксперимент поставлен на группе птиц - куры-бройлеры четырехлинейного кросса «РОСС-308» (родительские линии - породы корниш кросса ROSS 78F и ROSS 14M). Согласно литературным данным, 14 сутки эмбриогенеза, на которые проводился забор материала для исследований является критическим для гистации печени [6; 8]. Эксперимент поставлен в 2 повторности на 40 особях (20 особей служили контролем). Анализ соотношения путей программируемой клеточной гибели (ПКГ) и их регуляторов, пролиферативной активности гепатоцитов проводили иммуногистохимически, стрептавидин-биотиновым методом [9]. Показатели пролиферации гепатоцитов определяли с помощью выявления антител к белкам-маркерам PCNA (разведение 1:100, Novocastra). В дальнейшем проводился подсчет на 1000 гепатоцитов и PCNA-позитивных гепатоцитов и количества двуядерных форм (%). Выявление соотношения путей ПКГ гепатоцитов проводили, используя маркеры различных программ ПКГ: апоптоза (смерть клетки по типу I), осуществляли с помощью антител к белкам-маркерам каспазы-3 CPP32 (разведение 1:100, Novocastra); аутофагии (смерть клетки по типу II), определяли с помощью антител к белку-маркеру начальной стадии аутофагии LC3A/B (разведение 1:200, Abcam). Анализ путей регуляции программ ПКГ осуществляли с помощью выявления антител к белкам-маркерам p53 (разведение 1:80, Novocastra) и bcl-2 (разведение 1:100, Novocastra). Для цитофотометрического исследования состояния хроматина и распределения гепатоцитов по стадиям клеточного цикла мазки печени фиксировали в метаноле, окрашивали по Фельгену в модификации G.Olson в реактиве Шиффа [3]. Обработку препаратов проводили на автоматизированном морфометрическом комплексе «AxioPlan» («Carl Zeiss», Германия). Статистическую обработку полученных

данных осуществляли с помощью пакета прикладных программ «STATISTICA-6». Различия считались значимыми при $p=0,05$. При проведении эксперимента руководствовались принципами гуманного отношения к животным в соответствии с Международными рекомендациями [4].

Результаты исследования. У кур-бройлеров на 14-е сутки эмбриогенеза трубчатое строение паренхимы печеночного ацинуса не определяется. В цитоплазме гепатоцитов наблюдается умеренно-выраженная мелкокапельная жировая вакуолизация (рис. 1 Д). Сосуды портального тракта с признаками полнокровия. В области сосудов портального тракта и центральных вен отмечаются очаги кроветворения. Эритроциты в большом количестве выявляются в паренхиме печеночного ацинуса, что свидетельствует о процессах эритроцитопоэза.

Преимущественная локализация двуядерных и PCNA-позитивных гепатоцитов отмечается в перипортальной и центролобулярной зоне, соответственно распределение показателей пролиферации гепатоцитов проявляет porto-веноулярный градиент. В тоже время максимальное число двуядерных гепатоцитов выявлено и в области центральных вен (рис. 1 В).

CPP32-позитивные гепатоциты в большем количестве локализованы в перипортальной и центролобулярной зонах ацинуса, а LC3A/B-позитивные - в центролобулярной (рис. 1 А, Б, Г). Преимущественная локализация p53- и bcl-2-позитивных гепатоцитов отмечается в перипортальной зоне, соответственно распределение показателей носит porto-веноулярный градиент.

Таким образом, на фоне высоких показателей p53- и bcl-2-позитивных гепатоцитов гибель гепатоцитов реализуется по пути апоптоза в перипортальной и центролобулярной зоне. Тогда как в перивеноулярной зоне, где количество p53- и bcl-2-позитивных гепатоцитов наименьшее, реализуется программа аутофагии.

Необходимо отметить, что высокие показатели числа p53- и bcl-2-позитивных гепатоцитов и числа погибших гепатоцитов по пути апоптоза в области портального тракта и центролобулярной зоны соотносятся с наибольшим числом двуядерных и PCNA-позитивных гепатоцитов. Выявленные таким образом высокие показатели экспрессии белка p53 гепатоцитами не только регулируют реализацию путей ПКГ, но участвуют в регуляции процессов метаболизма и активности АОС [2]. В перивеноулярной зоне активация программы аутофагии гепатоцитов реализуется на фоне наибольшего числа двуядерных форм гепатоцитов. Активация аутофагии в области центральных вен, по всей видимости, индуцируется недостатком питательных веществ, кислорода, который имеет место быть у птенцовых [11, 12, 13].

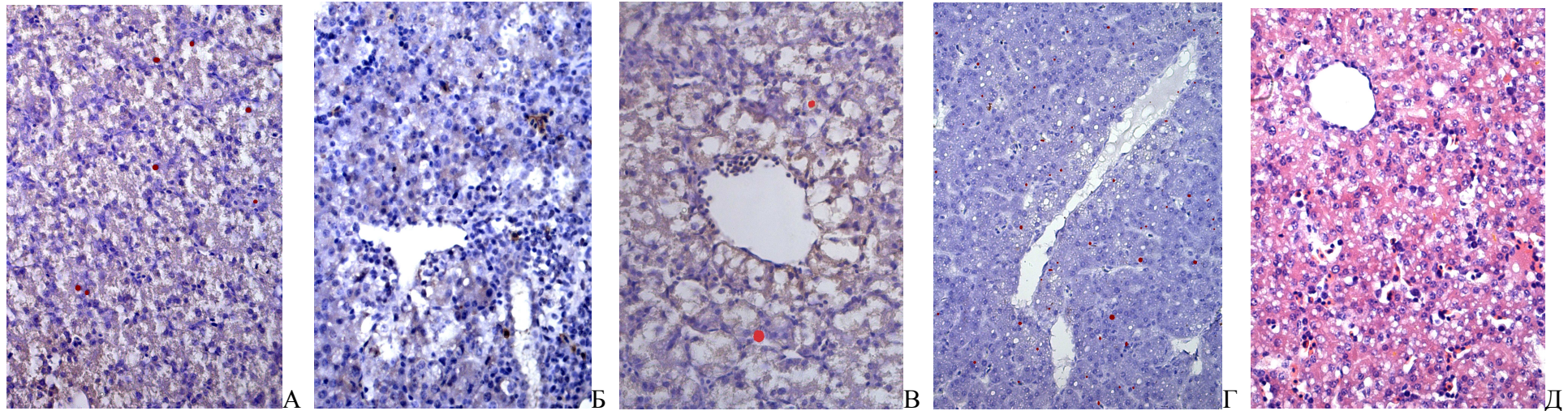


Рис. 1. Печень эмбрионов кур-бройлеров на 14 сутки развития. Увеличение ок10хоб20. Окрашивание антителами к CPP32 (А), антителами к LC3A/B (Б), антителами к PCNA (В), антителами к bcl-2 (Г). Протокол HIAR (Heat Induced Antigen Retrieval), стрептавидин-биотиновый метод (LSAB), хромоген АЭК. Окраска гематоксилин-эозин (Д)

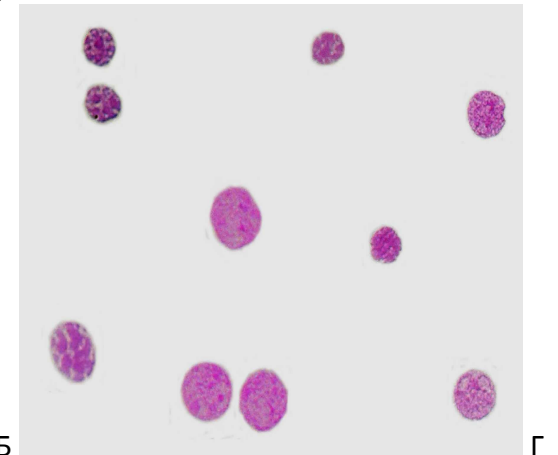
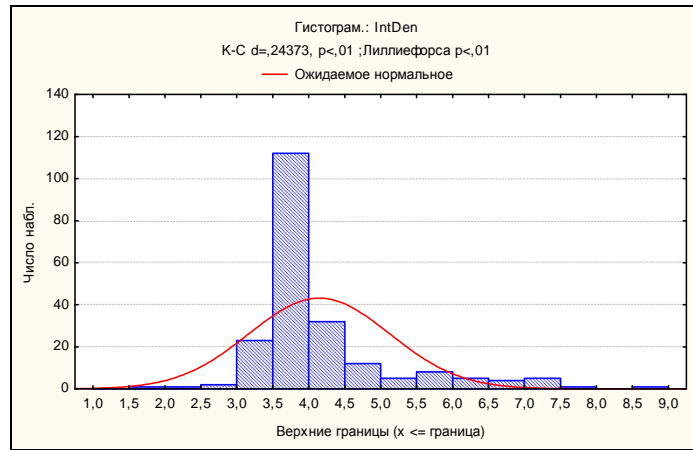
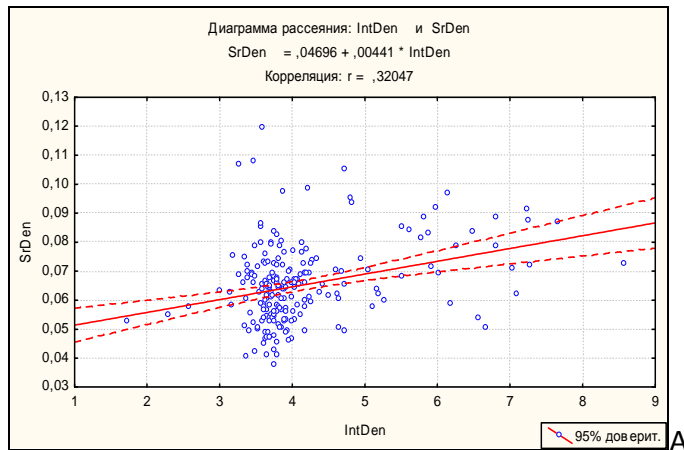


Рис. 2. Куры-бройлеры «РОСС-308». 14 сутки эмбрионального развития. Двумерное распределение ядер гепатоцитов по IntDen – интегральной оптической плотности ДНК и SrDen – средней оптической плотности ДНК (А). Гистограмма распределения популяции гепатоцитов по клеточному циклу. IntDen – интегральная оптическая плотность хроматина (Б). Многофакторный дисперсный анализ MANOVA. Ядра гепатоцитов. Окраска по Фельгену. Увеличение ок10хоб90. Гетерогенность топографии хроматина гепатоцитов (Г)

Согласно результатам цитофотометрии (рис. 2) на раннюю стадию эмбриогенеза выявленное большое количество гиподиплоидных гепатоцитов - 1,9%, сопровождается большим количеством изолированных участков гетерохроматина, вместе с тем 84% гепатоцитов находятся в стадии G₀/G₁ и 14% в активных фазах цикла пролиферации и полиплоидизации (S+G₂+M).

Согласно литературным данным для ранней стадии эмбриогенеза птиц характерны дефицит парциального содержания кислорода, не сформированная система терморегуляции, толерантная стратегия метаболической адаптации [5]. Вышеперечисленные условия развития во многом определяют выявленные нами особенности в поддержании тканевого гомеостаза. Так, на клеточном уровне большее количество погибших гепатоцитов определяется в центрлобулярной зоне, при этом на фоне высоких показателей p53-позитивных гепатоцитов, гибель клеток в равной мере реализуется по I и II пути, о чем можно судить по количеству CPP32- и LC3A/B-позитивных гепатоцитов [13]. В области портального тракта выявленные низкие показатели апоптоза, по всей видимости, поддерживаются высоким уровнем экспрессии гепатоцитами антиапоптотического белка bcl-2, который служит фактором выживания клетки, защищая ее от гибели, проявляя онкогенный эффект [10]. На фоне деструктивных процессов реализуются и процессы регенерации, так, в перипортальной зоне выявлены высокие показатели PCNA-позитивных гепатоцитов, и согласно цитофотометрии количество гепатоцитов в стадию S+G₂+M составляет 14% от общего числа гепатоцитов.

Таким образом иммуногистохимически и цитофотометрически определены тканевые показатели гомеостаза, пролиферативные зоны печеночного ацинуса, за счет которых осуществляется компенсаторно-приспособительные реакции, определяющие поддержание и становление гомеостаза на изучаемые критические периоды онтогенеза.

Список литературы

1. Антонова Е.И. Реактивность и пластичность тканевых компонентов печени в сравнительном ряду позвоночных в норме и после гипертермии: автореф.дис. ... док.биол.наук: Астрахань, 2009. – 44 с.
2. Желтухин А.О., Чумаков П.М. Повседневные и индуцируемые функции гена p53 // Успехи биологической химии. - 2010. - Т.50. - С. 447-516.
3. Козинец Г.И., Погорелов В.М., Шмаров Д.А., Боев С.Ф., Сазонов В.В. Клетки крови. Современные технологии их анализа / М.: Триада-Фарм, 2002.- 171 с.

4. Кополодзе Р.А. Регламентация экспериментов на животных – этика, законодательства, альтернативы // Успехи физиол. наук. - 1998.- Т.29, № 4. - С. 74-89.
5. Кулинский В.И., Ольховский И.А. Две адаптационные стратегии в неблагоприятных условиях – резистентная и толерантная. Роль гормонов и рецепторов // Успехи современной биологии.- 1992.- №6. – С. 697-714.
6. Курилкин В.В. Морфофункциональные показатели печени кур в постэмбриональном онтогенезе: диссертация ... кандидата ветеринарных наук: 06.02.01 / Курилкин Василий Владимирович; [Место защиты: Рос. ун-т дружбы народов].- Москва, 2011.- 130 с.
7. Ройтер Я., Гусева Н. Перспективы межвидовой гибридизации в птицеводстве // Птицеводство. - 2010. - №2. - С. 22-23.
8. Ткачёв, Д.А. Рост и развитие печени кур яичного кросса «ИЗА-браун» в постнатальном онтогенезе / Ткачёв Д.А., Ткачёв А.А. // Актуальные проблемы диагностики, терапии и профилактики болезней домашних животных: Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 80-летию факультета ветеринарной медицины Воронежского ГАУ. – Воронеж, 2006. – С.299-301.
9. Эллиниди В.Н. Аникиева Н.В., Максимова Н.А. Практическая иммуногистохимия / СПб.: ВЦЭРМ МЧС России. - 2002. - 36 с.
10. Danial N.N. Homeostatic functions of BCL-2 proteins beyond apoptosis / N.N. Danial, A. Gimenez-Cassina, D. Tondera// Adv Exp Med Biol. — 2010. — 687. — P.1-32.
11. Levine B. Autophagy in immunity and inflammation / B. Levine, N. Mizushima, H.W. Virgin// Nature. — 2011. — 469(7330). — P. 323–335.
12. Maiuri M.C. Autophagy regulation by p53 / M.C. Maiuri, L. Galluzzi, E. Morselli, O. Kepp, S.A. Malik, G. Kroemer // Current Opinion in Cell Biology. — 2010. — №22. — P. 181–185.
13. Scherz-Shouval R., p53-dependent regulation of autophagy protein LC3 supports cancer cell survival under prolonged starvation / R. Scherz-Shouval, H. Weidberg, C. Gonen, S. Wilder, Z. Elazar, M. Oren// Proc Natl Acad Sci U S A. — 2010. — 107(43):18511-6.

Рецензенты:

Молдавская А.А., д.м.н., профессор кафедры анатомии человека ГОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия», г. Астрахань;

Мкртчян О.З., д.б.н., профессор кафедры биологии и биологического образования ФГОБУ ВПО Омский государственный педагогический университет, г. Омск.