

ДИНАМИКА ИНТЕГРАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОРГАНИЗМА И МОРФОГЕНЕЗ ПЕЧЕНИ ПТИЦ В КРИТИЧЕСКИЕ ПЕРИОДЫ ЭМБРИОНАЛЬНОГО И ПОСТЭМБРИОНАЛЬНОГО ОНТОГЕНЕЗА

Хамитова Л.Е.

ФГБОУ ВПО Омский государственный педагогический университет, Омск, Россия (644099 Россия, г. Омск, наб. Тухачевского, 14), sagalbaeva@mail.ru

Морфогенез печени, на различных критических периодах эмбрио- и постэмбриогенеза, обеспечивается динамическим балансом между погибшими и пролиферирующими клетками, а также межклеточными стромально-паренхимными цитокоммуникациями, определяя степень зрелости и функциональную возможность органов и организма в целом. Так, в ходе исследований было выявлено, что клеточный состав периферической крови характеризуется значимым преобладанием лимфоцитов и сегментоядерных форм нейтрофилов в эмбриогенезе и преобладанием эозинофилов, базофилов и моноцитов в постэмбриогенезе, на фоне уменьшения числа палочкоядерных форм нейтрофилов. В паренхиме печеночного ацинуса в области портального тракта на фоне повышенной экспрессии белка bcl-2 на период эмбриогенеза угнетаются процессы апоптоза, а на 40 сутки реализуются оба пути гибели. И если в эмбриогенезе в данной зоне выявлено большое число обоих изучаемых стромальных цитотипов, то на 40-е сутки только тканевых макрофагов. В центрлобулярной зоне на 16 сутки эмбрионального развития ведущий путь гибели – апоптоз, к 40 суткам – количество CPP32-позитивных гепатоцитов снижается, тогда как показатели пролиферации повышаются. В перивенулярной зоне только в эмбриогенезе на фоне высокого количества p53-позитивных гепатоцитов реализуются процессы аутофагии. К 40 суткам пролиферация представлена ацитокинетическими митозами, в сопряжении с уменьшением числа стромальных цитотипов – CD68-позитивных макрофагов и десмин-позитивных клеток Ито.

Ключевые слова: морфогенез, печень, регенерация, гепатоциты, пролиферация, клетки Купфера, клетки Ито, цитокоммуникации, птицы, пути программируемой клеточной гибели, апоптоз, аутофагия, p53, bcl-2, зоны печеночного ацинуса, клетки крови, критические периоды онтогенеза.

DYNAMICS OF THE INTEGRAL INDICATORS OF THE ORGANISM AND BIRD LIVER MORPHOGENESIS DURING THE CRITICAL STAGES OF EMBRYONIC AND POST-EMBRYONIC ONTOGENESIS

Khamitova L.E.

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

In critical stages of embryo- and postembryogenesis liver morphogenesis is provided with a dynamic balance between the dead and proliferating cells as well as intercellular stromal-parenchymal communications determining the degree of maturity and functionality of organs and organism as a whole. It has been revealed that cell composition of the peripheral blood is characterized by a significant predominance of lymphocytes and segmented forms of neutrophils during embryogenesis and the overweight of eosinophils, basophils and monocytes in postembryonic period with reduced number of stab forms of the neutrophils. During the embryogenesis apoptosis is inhibited in the hepatic acinar parenchyma in portal tract area against the increased bcl-2 protein expression, and on the 40th day both pathways of death are realized. Moreover, in embryogenesis, a large number of both stromal cytotypes have been revealed in this zone but on the 40th day only tissue macrophages have been found. In central lobular zone apoptosis is the leading pathway of death on the 16th day of embryonic development. By the 40th day of embryogenesis the number of CPP32-positive hepatocytes decreases whereas proliferation indicators increase. In perivenular zone only in embryogenesis autophagy processes are realized against large number of p53-positive hepatocytes. By the 40th day proliferation is presented as acytokinetic mitosis with the decreased number of stromal cytotypes such as CD68-positive macrophages and desmin-positive Ito cells.

Keywords: morphogenesis, liver regeneration, hepatocytes, proliferation, Kupffer cells, Ito cells, cytocommunications, pathways of programmed cell death, apoptosis, autophagy, p53, bcl-2, hepatic acinar zone, blood cells, the critical stages of ontogenesis.

Изучение процессов морфогенеза печени на различные критические периоды эмбрионального и постэмбрионального онтогенеза ведет к пониманию степени зрелости и функциональных возможностей органов и организма в целом. Анализ этапов онтогенеза птиц позволяет лучше понять вектор эволюционных адаптаций к факторам среды обитания – усложнение и совершенствование морфогенеза печени в связи с высокой интенсивностью метаболических процессов, становлением новых механизмов устойчивости к стрессу, анатомо-физиологическими особенностями, связанными с полетом, особенностями организации генома [6; 8]. С этих позиций актуально изучение морфофункциональных особенностей развития органов и тканей, которые непосредственно участвуют в поддержании гомеостаза организма. Одним из органов является печень. Полифункциональность, быстрота вовлечения в деструктивные и репаративные процессы определяет интерес исследователей к сравнительному изучению закономерностей структурно-функциональной организации печени в эмбриональные и постэмбриональные чувствительные периоды развития, анализу адаптационных перестроек, выявлению механизмов, обеспечивающих развитие организма в целом [1]. Регенеративная биология рассматривает поддержание тканевого гомеостаза на организменном уровне (интегральные показатели крови), межклеточных стромально-паренхимных цитокоммуникаций органа, динамическому балансу между погибшими и пролиферирующими клетками на различные периоды онтогенеза согласно уровневости организации биологических систем. Антропогенные химические, физические и биологические факторы оказывают прямое и опосредованное, комбинированное и комплексное действие на организм птиц [2]. Таким образом, к жизни в городе приспособляются виды, которые имеют определенный адаптивный резерв, или широкой нормой реакции [7]. Соответственно экологический стресс, который испытывают городские популяции, выше. В связи с этим **целью** нашей работы является изучить динамику показателей клеточного состава периферической крови, переключение путей ПКГ гепатоцитов и их регуляцию, динамику стромально-паренхимных сопряженностей печени птиц вида *Columbalivia* в критические периоды эмбрио- и постэмбриогенеза.

Материалы и методы исследования

Для решения поставленных задач эксперимент поставлен на группе птиц вида *Columbalivia (formadomestica) Gmelin, 1789*. Все серии экспериментов проводили в две повторности на период эмбриогенеза – 16 сутки и на 40 сутки постэмбриогенеза. Декапитация и забор материала для исследований проводился под легким эфирным наркозом. В каждой экспериментальной группе было по 20 особей. Для изучения интегральных показателей организма проводили забор периферической крови птиц. На

препаратах проводили подсчет лейкоцитарной формулы. Для изучения и анализа стромально-паренхимного соотношения цитотипов печени, путей ПКГ, процессов пролиферации гепатоцитов использовали метод иммунофенотипирования [9]. Подсчет числа клеток в трех зонах ацинуса на световом микроскопе AxioImagerA1 с помощью программного обеспечения Axiovisionrev. 4.7. («CarlZeiss», Германия). 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 и количества двуядерных форм гепатоцитов(%). Количество и пространственную локализацию десмин-синтезирующей популяции клеток Ито проводили с помощью выявления антител к десмину (NCL-L-DES-DERIL, разведение 1:50, Novocastra); тканевых макрофагов с помощью выявления антител к CD68 (разведение 1:25, Termoscientific). Анализ путей и регуляции программируемой клеточной гибели (ПКГ) проводили с использованием антител к белкам-маркерам каспазы-3 (CPP32, Novocastra), к белкам LC3A/B (Abcam, Великобритания), белкам-маркерам p53 и bcl-2 (Novocastra, 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 и их обсуждение

Период **эмбрионального развития** характеризуется дефицитом парциального содержания кислорода, не сформированной системой терморегуляции, толерантной стратегией метаболической адаптации [5; 6; 14]. Гистологическое строение паренхимы печеночного ацинуса трубчатого типа (рис. 1Г). Клеточный состав периферической крови характеризуется значимым преобладанием лимфоцитов и сегментоядерных нейтрофилов, что отражает формирование иммунной системы эмбриона [9]. Бóльшее количество погибших гепатоцитов определяется в центрлобулярной зоне ацинуса, при этом ведущим путем гибели гепатоцитов является апоптоз (I тип), о чем можно судить по количеству CPP32-позитивных гепатоцитов (рис. 1А). II тип гибели гепатоцитов – аутофагия, исходя из количества LC3A/B-позитивных гепатоцитов, реализуется в перивенулярной зоне на фоне высокого количества p53-позитивных гепатоцитов (рис. 1Б). По всей видимости, в условиях недостатка питательных веществ p53 регулирует синтез белка LC3A/B – одного из ключевых участников процесса аутофагии [3; 13]. Наименьшее количество CPP32-позитивных выявлено в области портального тракта, данная сопряженность в реализации апоптоза соотносится с высоким уровнем экспрессии антиапоптотического белка bcl-2, который служит

фактором выживания гепатоцитов [12], предполагают, что bcl-2 может подавлять апоптоз путем регулируемого переноса $[Ca^{2+}]$ через мембрану ЭПР [11]. В центролобулярной зоне выявлено большое число PCNA-позитивных – и двуядерных форм гепатоцитов.

Наибольшее количество тканевых макрофагов выявлено в области портального тракта, а десмин-позитивных клеток Ито – в центролобулярной. Выявленное наибольшее число CD68-позитивных макрофагов, по всей видимости, связано с детоксикацией поступающих ксенобиотиков с током крови, усилением процессов по утилизации клеточного детрита, а также отражает процесс дифференцировки тканевых макрофагов из моноцитов крови.

Таким образом, цитокоммуникации в процессе морфогенеза представлены центролобулярной зоне сопряженностями таких показателей, как – большое число CPP32-так и LC3A/B-позитивных гепатоцитов (в большей мере CPP32-позитивных) с трансформацией клеток Ито в десмин-позитивные и увеличением числа двуядерных и PCNA-позитивных гепатоцитов. По всей видимости, активирующим фактором для трансформации клеток Ито стала потеря контактного торможения с гепатоцитами в связи с их гибелью и *TGF- α* , который высвобождается при гибели гепатоцитов [10]. При этом так как активированные клетки Ито являются единственным в печени источником фактора роста гепатоцитов HGF, который создает благоприятные условия микроокружения для дифференцировки двуядерных гепатоцитов *denovo*.

В перивенулярной зоне – на фоне повышенной экспрессии гепатоцитами p53 отмечается в большей мере реализация ПКГ по пути аутофагии, при этом количество bcl-2-, PCNA-позитивных гепатоцитов и десмин-позитивных клеток Ито минимально.

В области портального тракта – на фоне высоких показателей числа тканевых макрофагов, десмин-позитивных клеток Ито и экспрессии гепатоцитами белка bcl-2 выявлено снижение числа двуядерных гепатоцитов, количества погибших гепатоцитов по пути аутофагии и экспрессии гепатоцитами p53.

К **40-м суткам постэмбриогенеза** отмечается интенсивный рост организма, устанавливается гомойотермная температура тела, начинается период активных полетов [8]. Строение паренхимы печеночного ацинуса – трубчато-трабекулярное (рис. 2Г). В периферической крови количество сегментоядерных нейтрофилов, эозинофилов, базофилов более чем на 30 % увеличивается, однако количество палочкоядерных нейтрофилов на 43 % уменьшается, что может быть следствием стимулирующего действия лейкопоэтинов, адренокортикотропного и соматотропного гормона, нервной системы. Выявленное увеличение числа эозинофилов, по-видимому, связано с их участием в процессах каскадной регуляции функционирования клеток периферической крови.

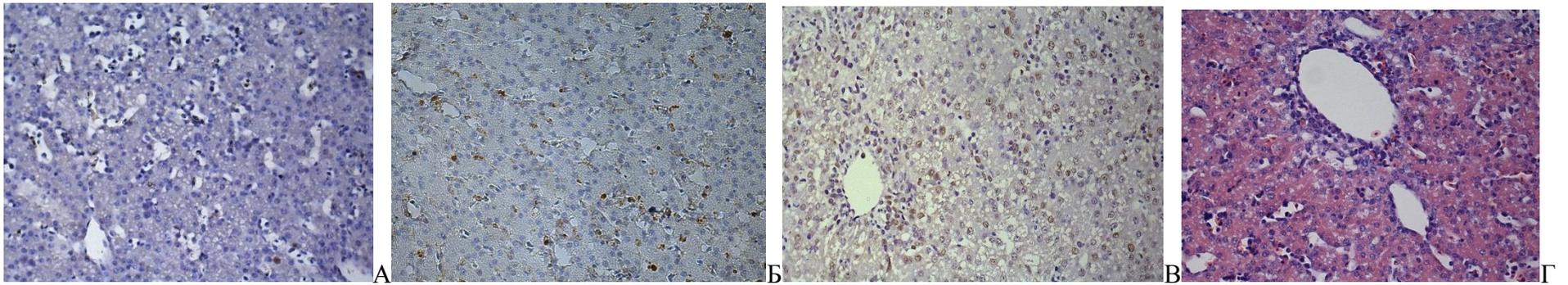


Рис. 1. Печень эмбрионов Columbalivia на 16 сутки развития. Увеличение ок10хоб20. Окрашивание антителами к CPP32 (А), антителами к LC3A/B (Б), антителами к PCNA(В). Протокол HIAR (HeatInducedAntigenRetrieval), стрептавидин-биотиновый метод (LSAB), хромоген АЭК. Окраска гематоксилин-эозин (Г)

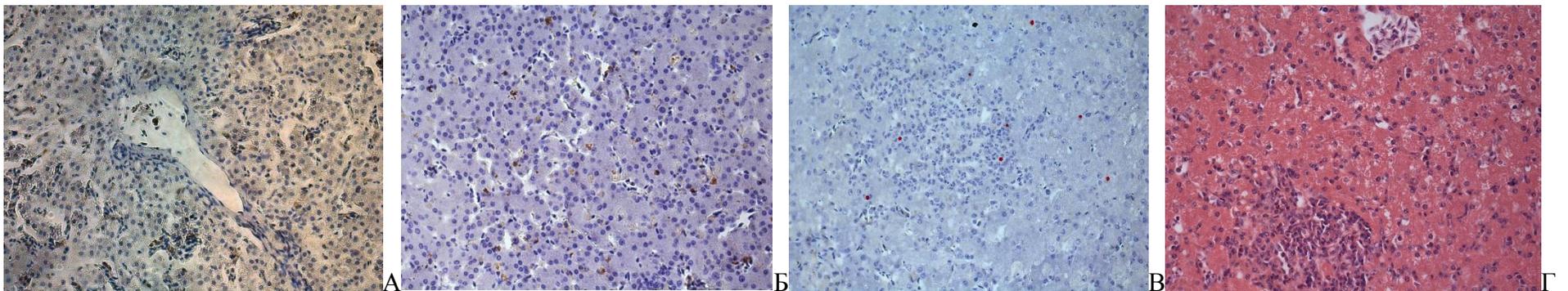


Рис. 2. Печень Columbalivia на 40 сутки постэмбрионального развития. Увеличение ок10хоб20. Окрашивание антителами к CD-68 (А), антителами к bcl-2 (Б), антителами к p53 (В). Протокол HIAR (HeatInducedAntigenRetrieval), стрептавидин-биотиновый метод (LSAB), хромоген АЭК. Окраска гематоксилин-эозин (Г), очаг некроза

В динамике изменения количества лимфоцитов выявлено уменьшение их числа на 22 %, а, следовательно, некоторое угнетение показателей гуморального иммунитета, тогда как количество моноцитов в 6 раз увеличивается. Столь резкое увеличение числа моноцитов отражает участие в формировании вместе с тканевыми макрофагами печени единой моноцитарно-макрофагальной системы и, следовательно, обеспечение естественной резистентности организма, и ранние проявления специфического иммунного ответа.

Во всех зонах ацинуса уменьшается число PCNA-позитивных гепатоцитов.

Согласно результатам иммунофенотипирования цитотипов печени в перипортальной зоне выявлено увеличение количества CPP32- и LC3A/B-позитивных гепатоцитов, причем в большей мере LC3A/B-позитивных – на 59 %. На фоне этого отмечено увеличение числа десмин-позитивных клеток Ито и снижение числа двуядерных форм гепатоцитов.

В централобулярной зоне на фоне уменьшения числа PCNA-позитивных гепатоцитов снижается количество тканевых макрофагов.

В области центральных вен – на фоне увеличения экспрессии гепатоцитами bcl-2 (рис. 2Б), выявлено увеличение числа двуядерных форм гепатоцитов, это является отражением активации ацитокинетических митозов. В то же время снижается количество тканевых макрофагов (рис. 2А) и десмин-позитивных клеток Ито.

Таким образом, в изучаемые критические периоды эмбрио- и постэмбриогенеза морфогенез печени сопровождается как деструктивными, так и пластическими изменениями. Эти реакции обеспечивают реализацию «функциональной сверхзадачи» механизмов срочной адаптации, которые, в свою очередь, обеспечивают поддержание тканевого гомеостаза на различных сроках онтогенеза. Выявленные изменения изучаемых показателей во многом определяют скорость, масштабы, способы и эффективность этапов регенерации, а эволюционно сформированная пространственно-топографическая цитокоммуникативная сопряженность – функционирование органа.

Список литературы

1. Антонова Е.И. Реактивность и пластичность тканевых компонентов печени в сравнительном ряду позвоночных в норме и после гипертермии: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Астрахань, 2009. – 44 с.
2. Егорова Г.В. Динамика фауны и населения птиц урбанизированных ландшафтов (на примере городов Мещерской низменности) // Естественные и технические науки. – 2011. – №1. – С. 49-54.

3. Желтухин А.О., Чумаков П.М. Повседневные и индуцируемые функции гена p53 // Успехи биологической химии. – 2010. – Т.50. – С. 447-516.
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. Микляева М.А., Родимцев А.С., Скрылева Л.Ф., Матвеев А.В. Особенности эмбрионального развития сизого голубя как представителя полуптенцовой эколого-физиологической группы птиц // Вестник Тамбовского университета. Серия: Естественные и технические науки. – 2013. – Т. 18, № 3. – С. 803-808.
7. Рахимов И.И., Леонова Т.Ш. Эколого-поведенческая адаптация воробьев к условиям урбанизированной среды // Вестник Чувашского государственного педагогического университета им. И.Я.Яковлева. – 2012. – № 2-1. – С. 124-129.
8. Родимцев А.С. Этапность и критические периоды раннего онтогенеза птенцовых птиц // автореф. дис. ... канд. биол. наук / А.С. Родмцев. – М., 2004. – 41с.
9. Эллиниди В.Н., Аникиева Н.В., Максимова Н.А. Практическая иммуногистохимия / СПб.: ВЦЭРМ МЧС России, 2002. – 36 с.
10. Senoo, H. Hepatic stellate cell (vitamin A-storing cell) and its relative-past, present and future / H. Senoo [et al.] // Cell Biol Int. – 2010. – Vol. 34, №12. – P. 1247-1272.
11. Danial N.N., Gimenez-Cassina A., Tondera D. Homeostatic functions of BCL-2 proteins beyond apoptosis // AdvExp Med Biol. – 2010. – Vol. 687. – P. 1-32.
12. Heath-Engel H.M., Wang B., Shore G.C. Bcl2 at the endoplasmic reticulum protects against a Bax/Bak-independent paraptosis-like cell death pathway initiated via p20Bap31 // BiochimBiophysActa. – 2012. – Vol. 1823, № 2. – P. 335-347.
13. Scherz-Shouval R., Weidberg H., Gonen C., Wilder S., Elazar Z., Oren M. p53-dependent regulation of autophagy protein LC3 supports cancer cell survival under prolonged starvation // Proc Natl AcadSci U S A. – 2010. – Vol. 107, № 43. – P. 18511-18516.
14. Toledo F.E., De Oliveira F.M., Alcântara D., Carvalho C.R., et al. Embryonic development of chicken (*Gallus Gallus Domesticus*) from 1st to 19th day-ectodermal structures // Microsc Res Tech. – 2013. – Vol. 76, №12. – P. 1217-1225.

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.