

14. Костюкевич С. В., Аничков Н. М., Иванова В. Ф., Орешко Л. С., Кудряшова Г. П., Медведева О. А. Смирнова О. А. Эндокринные клетки эпителия прямой кишки в норме, при неспецифическом язвенном колите и синдроме раздраженной кишки без лечения и при лечении преднизолоном и салофальком // Архив патологии. 2004. № 4. С. 23–27.

*Шаповалова Е. Ю., Бойко Т. А., Барановский Ю. Г.,
Каракулькина О. А., Барановский А. Г.*

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ГИБЕЛИ КЛЕТОК ОРГАНОВ ПРОИЗВОДНЫХ РАЗНЫХ ЗАРОДЫШЕВЫХ ЛИСТКОВ У ЧЕЛОВЕКА В ПРОЦЕССЕ РАННЕГО ЭМБРИОНАЛЬНОГО ГИСТОГЕНЕЗА

*Кафедра гистологии и эмбриологии (заведующая – проф. Е. Ю. Шаповалова)
Крымского государственного медицинского университета им. С. И. Георгиевского,
Симферополь, e-mail: Shapovalova_L@mail.ru*

Введение. Изучение закономерностей эмбрионального развития человека – главная задача более полувековых исследований ученых Крымской эмбриологической школы Крымского государственного медицинского университета. В основе пренатального онтогенеза человека лежит эмбриональный гистогенез. Согласно классическим представлениям, любой гистогенез представляет собой динамически организованную систему и включает в качестве базисных механизмов процессы клеточной и тканевой детерминации, роста, клеточной дифференцировки, пролиферации и гибели клеток, миграции и межклеточной интеграции [4]. Реализация этих процессов осуществляется на клеточном уровне и сопровождается фенотипическими изменениями клеток [3]. Проблема эмбрионального гистогенеза в наши дни приобрела особое звучание в связи с достижениями молекулярной биологии и, в частности, иммуногистохимии [1, 6]. Использование иммуногистохимических маркеров и систем визуализации в связи с их высокой чувствительностью и информативностью позволяет на клеточном и тканевом уровнях количественно оценить процессы клеточной пролиферации, дифференцировки и гибели клеток. Однако только в редких публикациях имеются прямые указания на развитие органов в соответствии с конкретными базовыми гистогенетическими процессами [2, 5]. В этой связи изучение пролиферации и гибели клеток органов, которые развиваются из разных зародышевых структур: первичной почки, кожи в области головы и поджелудочной железы эмбрионов и плодов человека, представляется крайне актуальным и своевременным.

Целью и задачей исследования явилось изучение индекса пролиферации, индекса готовности к апоптозу, индекса апоптоза и антиапоптотического индекса клеток первичной почки, кожи головы и поджелудочной железы у зародышей и плодов человека.

Материал и методы. Изучены 112 зародышей человека в возрасте от 21 суток до 12 недель внутриутробного развития на стадиях последовательно от раннего периода нервного желобка до начала дефинитивного плодного периода. Эмбрионы и плоды быстро фиксировали 10 % забуференным нейтральным формалином сразу же после операции *abrasio*. Материал заливали в парафин и из них изготавливали серийные срезы толщиной 5–6 мкм. Иммуногистохимические реакции проводили в парафиновых срезах метанефроса, кожи головы и поджелудочной железы с использованием соответствующих первичных антител Ki-67, CD 95 / Apo 1, Bcl-2 и p53 (DAKO) и системы визуализации En vision (DAKO). Ядра докрашивали гематоксилином. Тепловое демаскирование антигенов проводили в микроволновой печи Samsung M 1915 NR при фиксированной мощности 800 Вт в течение 2 минут. Индекс пролиферации, готовности к апоптозу, индекс апоптоза, антиапоптотический индекс определяли путем подсчета количества Ki-67, CD 95 / Apo 1, p53 и Bcl-2-позитивных клеток на 100 клеток соответствующих структур первичной почки и поджелудочной железы при увеличении $\times 1350$ с последующим вычислением показателя в процентах.

Результаты и обсуждение. В мезонефросе, развивающемся из мезодермы и являющемся провизорным органом, в разное время существуют развивающиеся, развитые и редуцирующиеся мезонефроны. Развивающиеся мезонефроны присутствуют в первичной почке у зародышей до 45–46 суток (16–17 мм теменно-копчиковой длины). Среди клеток развивающихся мезонефронов и окружающей их ЭСТ индекс пролиферации и антиапоптотический индекс очень высокие (рис. 1). Индексы апоптоза и готовности к апоптозу низки (рис. 2). Возможно, именно высокая экспрессия антиапоптотического гена Bcl-2 обеспечивает дифференцировку клеток и препятствует их гибели [9]. В развитых мезонефронах индексы пролиферации и апоптоза сравнительно высоки и примерно находятся на одном уровне. Антиапоптотический индекс невысок. Клетки, готовые к рецепторному апоптозу, т. е. имеющие рецепторы CD95, единичны. Среди клеток ЭСТ все изученные индексы значительно ниже, хотя сохраняют те же закономерности. В этих популяциях клеток скорость репродукции восполняет потери. Происходит постоянная замена гибнущих клеток. Такая популяция относится (по А. А. Клишову) [3] к обновляющейся клеточной популяции. По мере взросления зародышей все изученные индексы клеток развитых мезонефронов и ЭСТ этих регионов постепенно незначительно снижаются.

Вопрос о механизме инволюции мезонефроса окончательно не решен. По нашим данным, в клетках редуцирующих мезонефронов и окружающей их эмбриональной соединительной ткани индекс пролиферации и антиапоптотический индекс низки. Отсутствие экспрессии гена Bcl-2 позволяет таким клеткам запустить генетическую программу клеточной гибели [8]. Индекс апоптоза высок и с возрастом незначительно увеличивается. Вместе с тем индекс готовности к апоптозу мал. Обновление такой клеточной популяции слабое, что приводит к дегенерации мезонефронов и, в конечном счете, всей первичной почки.

В каждый момент времени поджелудочная железа, развивающаяся из энтодермы, имеет главный выводной проток, проксимальные закладки, которые образовались ранее, и дистальные закладки, которые еще только образуются.

Эпителиальный пласт проксимальных отделов ветвящихся закладок имеет большее количество рядов клеток по сравнению с дистальными. В эпителии вновь появившихся закладок выводных протоков и ацинусов и мезенхиме вокруг них присутствует высокий индекс пролиферации и антиапоптотический индекс составляющих их клеток (см. рис. 1). Индексы апоптоза и готовности к апоптозу низкие (см. рис. 2).

По А. А. Клишову [3] – это растущая клеточная популяция. В сформировавшихся протоках индексы пролиферации и апоптоза сравнительно высоки и примерно находятся на одном уровне. Антиапоптотический индекс невысок. Клетки, готовые к рецепторному апоптозу, т. е. имеющие рецепторы CD95, единичны.

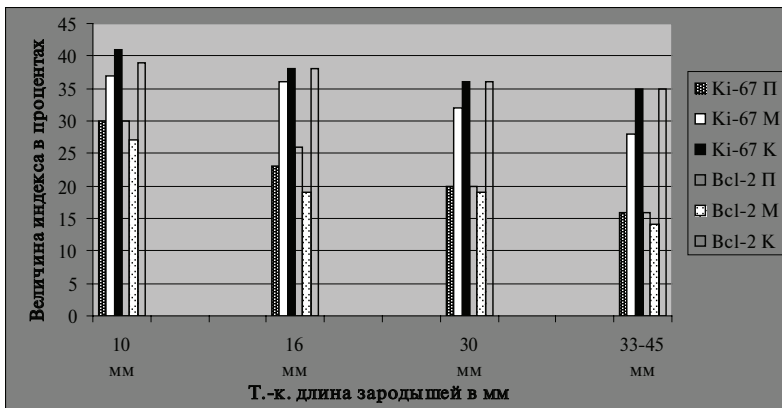


Рис. 1. Индекс пролиферации (Ki-67-позитивные клетки) и антиапоптотический индекс (Bcl-2-позитивные клетки) клеток сосудистых клубочков мезонефронов (М) в стадии расцвета, эпителиоцитов главного выводного протока поджелудочной железы (П) и клеток эпидермиса кожи головы

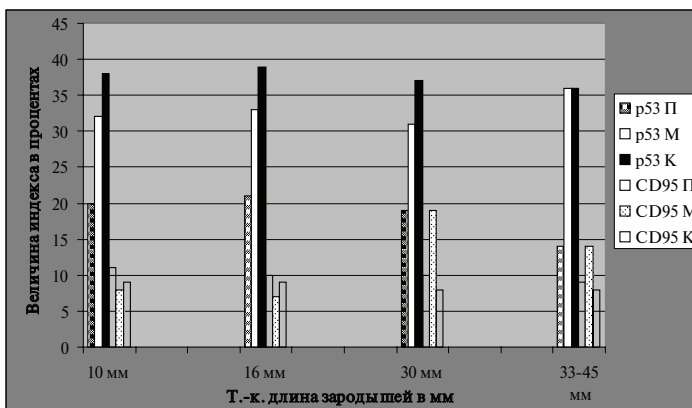


Рис. 2. Индекс апоптоза (p53-позитивные клетки) и индекс готовности к апоптозу (CD95-позитивные клетки) клеток сосудистых клубочков мезонефронов (М) в стадии расцвета, эпителиоцитов главного выводного протока поджелудочной железы (П) и клеток эпидермиса кожи головы

Среди клеток эмбриональной соединительной ткани все изученные индексы значительно ниже, хотя сохраняют те же закономерности. В этих популяциях скорость репродукции клеток восполняет потери. Происходит постоянная замена гибнущих клеток. Такая популяция относится, по А. А. Клишову [3], к обновляющейся клеточной популяции. По мере взросления зародышей все изученные индексы клеток сформировавшихся протоков и эмбриональной соединительной ткани этих регионов понемногу незначительно снижаются. В эпителии и мезенхиме главного выводного протока поджелудочной железы, который закладывался первым, по мере взросления зародышей индекс пролиферации и антиапоптотический индекс постепенно снижаются, но остаются заметно выше, чем индекс апоптоза и индекс готовности к апоптозу.

По мере развития и стабилизации структуры в эпителии и эмбриональной соединительной ткани главного выводного протока железы насчитываются самые низкие показатели изученных индексов по сравнению с эпителием и эмбриональной соединительной тканью других имеющихся выводных протоков. Клетки приобретают признаки дефинитивного строения, что коррелирует с низким уровнем антиапоптотического индекса.

У самого раннего изученного нами зародыша в возрасте 21 суток (1,4 мм теменно-копчиковой длины) туловище покрыто однослойным кубическим эпителием. До 38 суток (10 мм длины) у зародышей прослеживается однослойный эктодермальный покров, формирующий в дальнейшем эпидермис кожи. Индексы пролиферации и апоптоза клеток эпидермиса кожи головы сравнительно высоки и находятся примерно на одном уровне ($40,71 \pm 0,35$ и $38,60 \pm 0,28$) (см. рис. 1, 2), что позволяет отнести эпидермис к обновляющейся клеточной популяции. CD95-позитивные клетки в коже головы (индекс готовности к апоптозу) составляют $9,10 \pm 0,13$. Экспрессия гена Bcl-2, препятствующая вступлению клеток в апоптоз, высока в клетках эпидермиса. Высокие показатели индекса пролиферации и антиапоптотического индекса свидетельствует о более активном размножении клеток и последующей их дифференцировке [7]. На 45-е сутки (зародыши 16 мм длины) развивающийся эпидермис состоит уже из 2 рядов кубических клеток. На поверхности кубических клеток лежит один слой плоских клеток перидермы с овальными темными ядрами. К концу второго месяца эмбриогенеза (зародыши 30 мм длины) эпидермис головы имеет трехслойное строение. На базальной мембране лежат высокие призматические клетки с овальными ядрами. Второй слой образуют низкие кубические слабобазофильные клетки. Круглые ядра эпителиоцитов промежуточного слоя расположены в центре. Поверхностный слой состоит из уплощенных клеток с удлинненными ядрами. Высокие антиапоптотический индекс ($36,09 \pm 0,19$) и индекс пролиферации ($36,12 \pm 0,24$) свойственны эпидермоцитам кожи головы, что свидетельствует об активных процессах формообразования и дифференцировки. Клетки этой закладки также активно подвержены апоптозу: индекс апоптоза — $36,93 \pm 0,32$, индекс готовности к апоптозу — $8,75 \pm 0,06$. На 10-й неделе пренатального развития (зародыши 33–45 мм т.-к. длины) продолжается развитие кожи. На срезах она представлена эпидермисом и производной мезенхимы дермой. Граница между эпидермисом и дермой четкая и ровная. Слои дермы не сформированы.

Индекс пролиферации, апоптоза, готовности к апоптозу и антиапоптотический индекс эпителиоцитов эпидермиса кожи головы составляют соответственно $35,57 \pm 0,33$ (уменьшился на 1,6 % по сравнению с плодами в возрасте 60 суток – 9 недель, 60–62 мм длины); $36,04 \pm 0,21$ (уменьшился на 2,5 %); $8,75 \pm 0,06$ (не изменился) и $35,055 \pm 0,29$ (уменьшился на 1,5 %). Индекс пролиферации и апоптоза эпидермоцитов кожи туловища снизился на 1,9 % и 2,2 % составляет $34,12 \pm 0,26$ и $37,02 \pm 0,24$ соответственно. Обращает на себя внимание, что процессы апоптоза продолжают превалировать над размножением клеток. Индекс готовности к апоптозу также уменьшился на 3,7 % ($7,75 \pm 0,02$). Антиапоптотический индекс тех же клеток, препятствующий запуску программы гибели клеток, остается высоким на уровне индекса пролиферации.

Выводы. 1. В наиболее развитых в конкретный момент времени структурах поджелудочной железы (эпителий главного выводного протока) и мезонефронах мезонефроса индексы пролиферации и апоптоза составляющих их клеток примерно одинаково высоки. Индекс готовности к апоптозу и антиапоптотический индекс не высоки. По мере взросления зародышей индекс пролиферации и антиапоптотический индекс постепенно снижаются, но остаются заметно выше, чем индекс апоптоза и готовности к апоптозу.

2. В коже индексы пролиферации и апоптоза и антиапоптотический индекс составляющих их клеток примерно одинаково высоки, хотя по мере взросления зародышей и плодов постепенно снижаются. Индекс готовности к апоптозу изменяется мало.

3. В эпителии вновь появившихся закладок обоих органов и мезенхиме вокруг них присутствует высокий индекс пролиферации и антиапоптотический индекс составляющих их клеток. Индексы апоптоза и готовности к апоптозу низкие.

4. В дегенерирующих мезонефронах индекс пролиферации и антиапоптотический индекс клеток очень низки. Индекс апоптоза находится на высоком уровне. Индекс готовности к апоптозу выражен умеренно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Горелова Н. И. Иммуногистохимическая характеристика раннего кардиомиогенеза человека // Вісник морфології. 2004. Т. 10. № 2. С. 242–245.
2. Жарков С. В., Шаповалова Е. Ю., Харченко С. В. Маннозоконъюгаты в нормальном эмбриогенезе первичной и окончательной почки // Вісник морфології. 2007. Т. 13. № 2. С. 319–323.
3. Клишов. А. А. Гистогенез и регенерация тканей. Л.: Медицина, 1984.
4. Кнорре А. Г. Эмбриональный гистогенез (морфологические очерки). Л.: Медицина, 1971.
5. Шаповалова Е. Ю., Луцки А. Д. Изменение углеводного состава тканей в процессе раннего эмбрионального гистогенеза поджелудочной железы у человека // Таврический медико-биологический вестник. 2000. № 3–4. С. 193–197.
6. Chung E. Y., Kim S. J., Ma X. J. Regulation of cytokine production during phagocytosis of apoptotic cells // Cell Res. 2006. Vol. 16. P. 154–161.

7. *Fesus L. P., Davis J. A., Piacentini M.* Apoptosis; Molecular mechanisms in programmed cell death // *Europ. J. Cell Biol.* 1991. Vol. 747. P. 195–204.
8. *LeBrun D. P., Warnke R. A., Cleary M. L.* Expression of Bcl-2 in fetal tissues suggests a role in morphogenesis // *Am OJ Pathol.* 1993. Vol. 142. № 3. P. 743–753.
9. *Zhomykina O. I., Pritulo O. A., Shapovalova Ye. Yu.* Proliferation, apoptosis and its negative regulator Bcl-2 at different stages of psoriasis // *Tavrisheskiy Mediko-Biological Vestnik.* 2007. Vol. 10. № 10. P. 103–105.

Шевлюк Н. Н., Радченко А. В., Кирилличев А. И.

ОСОБЕННОСТИ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПЕРЕДНЕГО ЭПИТЕЛИЯ РОГОВИЦЫ КРОЛИКА В УСЛОВИЯХ ЧАСТИЧНОГО И ПОЛНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ЛИМБА РОГОВИЦЫ

*Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии
(заведующий – заслуженный деятель науки РФ проф. А. А. Стадников)
Оренбургской государственной медицинской академии, Оренбург;
Кафедра глазных болезней (заведующий – д. м. н. А. Е. Апрелев)
Оренбургской государственной медицинской академии,
Оренбург, e-mail: k_histology@orgma.ru*

В последние десятилетия было выяснено, что источником восстановления переднего эпителия роговицы (как в случае физиологической, так и репаративной регенерации) являются камбиальные (стволовые) элементы, которые локализованы в эпителии в области лимба роговицы [1, 2, 4]. Имеются и работы, исследующие репаративные процессы в роговице с учётом роли и значимости клеток эпителия лимба в этих процессах [1, 3, 5]. Тем не менее многие аспекты морфофункциональной характеристики эпителия лимба роговицы, прежде всего, вопросы, касающиеся роли и значимости лимба в обеспечении регенераторных потенции переднего эпителия роговицы, нуждаются в уточнении и дополнении.

Целью исследования явилось выяснение особенностей регенерации переднего эпителия роговицы в условиях частичного и полного повреждения лимба роговицы.

Материал и методы исследования. Объектом исследования служили 40 половозрелых кроликов породы «Шиншилла» массой 2,5–3,0 кг (32 экспериментальных и 8 контрольных). Экспериментальные животные были разделены на 4 группы по 28 животных в каждой группе. Повреждение области лимба осуществляли под местной анестезией воздействием на область лимба диатермокоагулятором (аппарат электрохирургический высокочастотный ЭХВЧ – 80–82). У животных 1-й группы повреждали 1/4 лимба, у животных 2-й группы – 1/2, у животных 3-й группы – 3/4. Животным 4-й группы проводили полное разрушение лимбальной области. Экспериментальные животные содержались в стандартных условиях вивария. При выполнении экспериментального исследования соблюдали все правила, регламентирующие работу с экспериментальными животными.