

УДК 611.611:611-018+611-013.7/8

© Т.А. Бойко, Е. Ю. Шаповалова, 2009.

АПОПТОЗ И ПРОЛИФЕРАЦИЯ КЛЕТОК ОБЕСПЕЧИВАЮТ РАСЦВЕТ И РЕДУКЦИЮ ПЕРВИЧНОЙ ПОЧКИ У ЭМБРИОНОВ ЧЕЛОВЕКА

Т. А. Бойко, Е. Ю. Шаповалова

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. – профессор Е. Ю. Шаповалова) Крымского государственного медицинского университета им. С. И. Георгиевского, г. Симферополь.

APOPTOSIS AND PROLIFERATION PROVIDE DEVELOPMENT AND REDUCTION OF MESONEPHROS IN HUMAN EMBRYOS

Т. А. Boiko, Ye.Yu. Shapovalova

SUMMARY

In 56 human embryos in the age from 21 day to 12 weeks of the intrauterus development at absence of the obviously expressed damaging factors of external environment, which includes stage X - XXIII and beginning of the fetal period by classification of Carnegie institute, index of proliferation (Ki-67-positive cells), index of apoptosis (p53- positive cells), index of readiness to the apoptosis (CD95- positive cells) and antiapoptosis index (Bcl-2-positive cells) of mesonephros cells have been revealed. In developed mesonephrons indexes of proliferation and apoptosis of their cells approximately are identically high. The index of proliferation and antiapoptosis index are low in degenerative mesonephrons. In developing mesonephrons these indexes are very high. The index of readiness to the apoptosis and antiapoptosis index is not high in the developed regions of mesonephros. Degeneration of mesonephros takes place by an apoptosis.

АПОПТОЗ ТА ПРОЛІФЕРАЦІЯ ЗАБЕЗПЕЧУЮТЬ РОЗКВІТ ТА РЕДУКЦІЮ ПЕРВИННОЇ НИРКИ У ЕМБРІОНІВ ЛЮДИНИ

Т. А. Бойко, Е. Ю. Шаповалова

РЕЗЮМЕ

Вивчено 56 зародків людини у віці від 21 доби до 12 тижнів внутрішньоутробного розвитку на стадіях послідовно від раннього періоду нервового жолобка до початку дефінітивного плодного періоду. Імуногістохімічно вивчений індекс проліферації (Ki-67-позитивні клітини), апоптозу (p53-позитивні клітини), індекс готовності до апоптозу (CD95-позитивні клітини) і антиапоптотичний індекс (Bcl-2-позитивні клітини) клітин первинної нирки. У розвинених мезонефронах індекси проліферації і апоптозу складових їх клітин приблизно однаково високі. Індекс проліферації і антиапоптотичний індекс знижені в дегенеруючих і підвищені в мезонефронах, що розвиваються. Індекс готовності до апоптозу і антиапоптотичний індекс не високі в розвинених відділах первинної нирки. Дегенерація відділів мезонефроса відбувається шляхом апоптозу.

Ключевые слова: эмбрионы человека, пролиферация, апоптоз, первичная почка.

Дифференцировка клеток и тканей – это результат взаимодействия не только стимулирующих, но и

подавляющих сигналов, поэтому генетически запрограммированная клеточная смерть (апоптоз) является неотъемлемой частью развития зародыша, эмбриона и плода, как и функционирования взрослого организма [6]. Апоптоз – выборочная или изолированная гибель клетки, управляемая геномом этой же клетки [2]. Несмотря на возрастающий объем информации о роли апоптоза в онкогенезе, его значение в раннем развитии человека пока можно определить лишь в общих чертах. Следует считать апоптоз эффективным способом удаления клеток с генетическими повреждениями. Апоптозное «самоочищение» - универсальный механизм для поддержания гено- и фенотипической однородности эмбриональных клеток и тканей. Тонкая система равновесия между дифференциацией и апоптозом (развитием и управляемой гибелью клеток) – ключевой механизм развития [1]. Известно, что в

развивающейся нервной системе, органах чувств, краниальной области эмбрионов и плодов человека экспрессия маркеров пролиферации увеличивается с возрастом, в то время как уровень апоптоза тут снижается [4].

Мезонефрос или первичная почка является провизорным органом в развитии эмбрионов человека, которая закладывается очень рано, расцветает и функционирует и сравнительно быстро редуцируется. Сведения о пролиферации и апоптозе клеток почки, механизме редукции мезонефроса отсутствуют в доступной литературе.

Целью нашего исследования явилось изучение индекса пролиферации, индекса готовности к апоптозу и апоптоза, индекса Bcl-2-позитивных клеток первичной почки в процессе ее развития, расцвета и регрессии у зародышей человека, развивавшихся в матке при отсутствии явно выраженных

повреждающих факторов внешней и внутренней среды.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучены 56 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 изготовляли серийные срезы толщиной 5-6 мкм. Пролиферативную активность клеток изучали с помощью моноклональных антител Ki-67 (MIB-1), которые идентифицируют ядерный антиген, присутствующий у большинства пролиферативных клеток.

Антиген Ki-67, определяемый соответствующими моноклональными антителами, короткоживущий протеин, разрушающийся на протяжении 1-1,5 часа. Благодаря этому Ki-67 выявляется только в клетках, которые делятся, т.к. не успевает накапливаться и не остается в спокойных клетках [3].

Для оценки готовности клеток мезонефроса к рецепторному апоптозу и вычисления индекса готовности к апоптозу использовали моноклональные антитела к Fas-рецепторам (CD 95 / Apo 1). Центральную роль в развитии апоптоза играет так называемый «дикий» («wild») тип гена – онкосупрессора *wt p53* и кодируемый им протеин *p53* [5].

В исследовании он используется для определения числа клеток, находящихся в стадии апоптоза. Белки типа Bcl (B-cell lymphoma) регулируют апоптоз на докаспазной стадии путем инактивирования прокаспаз. Антиапоптотический белок Bcl-2 пролонгирует жизнь клетки, блокируя апоптоз.

Иммуногистохимические реакции проводили в

парафиновых срезах мезонефроса с использованием соответствующих первичных антител Ki-67, CD 95 / Apo 1, Bcl-2 и p53 (DAKO) и системы визуализации En vision (DAKO). Ядра докрасивали 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 и апоптоза, антиапоптотический индекс определяли путем подсчета количества Ki-67, CD 95 / Apo 1, p53 и Bcl-2-позитивных клеток на 100 клеток мезонефроса при увеличении $\times 1350$ с последующим вычислением показателя в процентах в среднем по результатам всех изученных зародышей каждого возраста.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У зародышей в возрасте 37-41 суток (9-12 мм длины) Вольфовы тела, входящие в состав выделительной системы, достигли наивысшего развития, простираясь от первого грудного до первого поясничного сегмента.

Первичная почка обладает структурными признаками, свидетельствующими о высоком уровне органоспецифической дифференцировки и функциональной активности как подавляющего большинства мезонефральных нефронов в частности, так и всего органа в целом.

Дифференцированное Вольфово тело состоит из нефронов, располагающихся один над другим по вертикали. Мезонефральные нефроны содержат тельца и дифференцированные каналцы. Тельца представляют собой сосудистые клубочки и мезангий, окруженные двустенной капсулой, состоящей из плоских клеток со слабо оксифильной цитоплазмой и вытянутыми ядрами. Индекс пролиферации и апоптоза клеток сосудистых клубочков высоки и находятся примерно на одном уровне ($36,8 \pm 0,34$ и $31,8 \pm 0,28$) (рис. 1) (рис. 2).

Антиапоптотический индекс тех же клеток существенно ниже и составляет $26,5 \pm 0,44$.

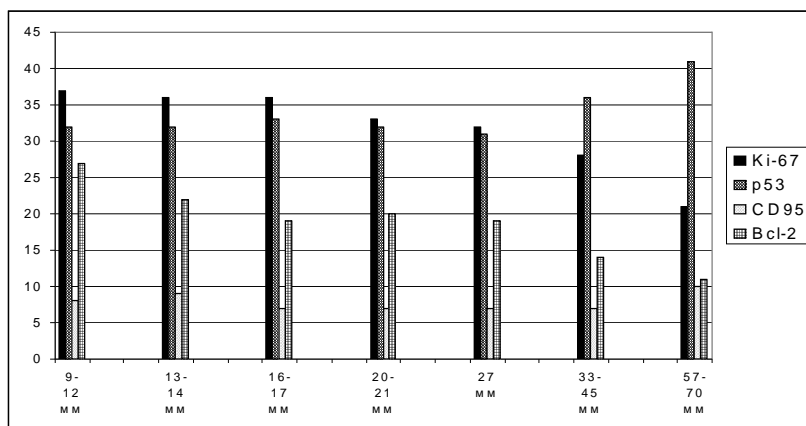


Рис. 1. Индекс пролиферации (Ki-67-позитивные клетки), апоптоза (p53-позитивные клетки), индекс готовности к апоптозу (CD95-позитивные клетки) и антиапоптотический индекс (Bcl-2-позитивные клетки) клеток сосудистых клубочков мезонефрона в стадии расцвета.

Висцеральный листок плотно сращен с эндотелием сосудов. Между листками хорошо выражена полость. Капсула телец переходит в S-образно изогнутые каналы, впадающие в Вольфов проток. Канальцы окружены капиллярами, по которым кровь из клубочков возвращается в субкаринальные вены. Между клубочками и канальцами находятся небольшие прослойки мезенхимы.

У зародышей в возрасте 42-43 суток (13-14 мм длины) в мезонефросе в краниальных частях произошла дегенерация сосудистых клубочков, а канальцы потеряли характерную изогнутость, обнаруживая тенденцию к разрушению.

Индекс пролиферации клеток сосудистых клубочков снизился на 74,5% по сравнению с развитыми клубочками зародышей в возрасте 37-41 суток (9-12 мм длины) и составляет $9,4 \pm 0,31$.

Индекс апоптоза клеток сосудистых клубочков увеличился на 44,9% и составляет $57,7 \pm 0,58$.

Индекс готовности к апоптозу увеличился на 61,7% и составляет $21,4 \pm 0,26$. Антиапоптотический индекс снизился на 74,3% и составляет $6,8 \pm 0,03$.

Этот процесс наблюдается на уровне двух первых грудных сегментов. Особенностью мезонефральных телец средних отделов мезонефроса, находящихся в стадии расцвета, является разнообразие размеров и формы. Их размеры варьируют в широких пределах. Все изученные индексы существенно не изменились по сравнению с зародышами в возрасте 37-41 суток (9-12 мм длины) (см. рис.1). В каудальных отделах первичной почки образуются новые мезонефроны из мезодермы. Клубочки здесь почти отсутствуют. Индекс пролиферации и антиапоптотический индекс

клеток сосудистых клубочков очень высоки и составляют $69,3 \pm 0,52$ и $80,5 \pm 0,39$ соответственно. Индекс апоптоза и готовности к апоптозу малы и составляют $10,5 \pm 0,12$ и $8,5 \pm 0,11$.

В срезах зародышей в возрасте 45-46 суток (16-17 мм длины) обнаруживается, что в мезонефросе дегенерация канальцев и клубочков распространилась до уровня четвертого грудного сегмента. Индекс пролиферации клеток сосудистых клубочков снизился на 12,8% по сравнению с зародышами в возрасте 42-43 суток (13-14 мм длины) и составляет $8,2 \pm 0,46$. Индекс апоптоза клеток сосудистых клубочков остался на прежнем уровне и составляет $57,2 \pm 0,38$. Индекс готовности к апоптозу уменьшился на 9,9% и составляет $19,3 \pm 0,26$. Антиапоптотический индекс не изменился и составляет $6,4 \pm 0,12$.

Более каудальные почечные тельца мезонефронов состоят из сосудистых клубочков и мезангия, окруженных двустенной капсулой. Висцеральный листок плотно сращен с эндотелием сосудов. Парьетальный листок капсулы состоит из плоских клеток со слабо оксифильной цитоплазмой и вытянутыми ядрами.

Между листками хорошо выражена полость, заполненная секретом. Все изученные индексы существенно не изменились по сравнению с зародышами в возрасте 42-43 суток (13-14 мм длины) (см. рис.2).

Развитие канальцы выстланы однослойным кубическим эпителием и содержат секрет. Новообразование мезонефронов не прослеживается.

Изучение срезов зародышей 49-50 суток (20-21 мм длины) показало, что процесс дегенерации

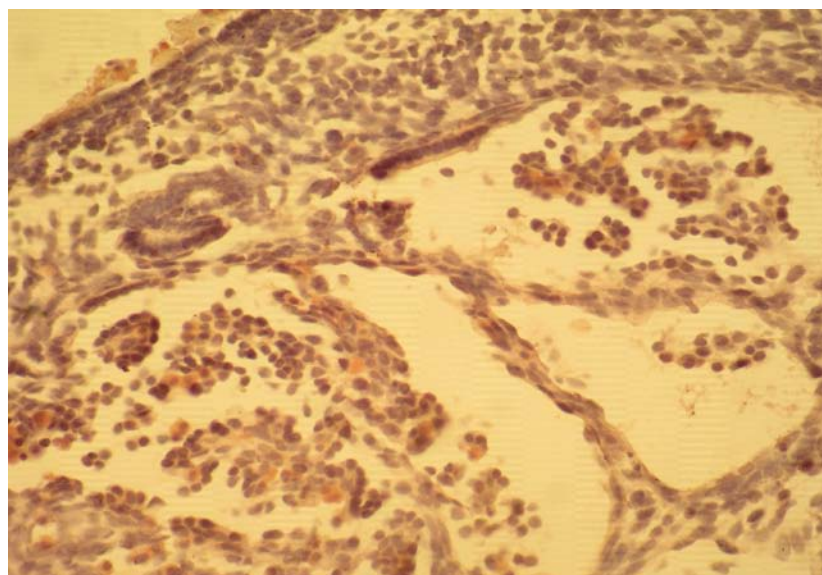


Рис. 2. Плодный период. Зародыш в возрасте 12 недель (70 мм длины). Клетки в состоянии пролиферации в мезонефросе. Окраска Ki-67 с докраской ядер гематоксилином. Визуализация в система LSAB. Увеличение: об. 40, ок. 10.

Вольфовых тел распространился до уровня XII грудного позвонка. В наиболее каудальных отделах еще сохранились развитые сосудистые клубочки и мочевые канальцы, впадающие в Вольфовы протоки. Тонкое строение нефронов и протоков такое же, как у более молодых зародышей. Все изученные индексы существенно не изменились по сравнению с зародышами в возрасте 42-43 суток (13-14 мм длины) (см. рис. 1). Новообразования клубочков и канальцев в каудальных частях первичной почки уже не происходит.

У зародышей в возрасте старше 57 суток (27 мм длины) мезонефрос в средних отделах полностью редуцировался, сохраняя свое строение только на уровне гонад. По мере взросления плодов до конца изученного периода внутриутробной жизни (зародыши 12 недель, 57-70 мм длины) мезонефрос подвергается дальнейшей редукции. В нем насчитывается очень мало функционирующих дифференцированных мезонефронов.

Индекс пролиферации клеток сосудистых клубочков снизился на 36% по сравнению с развитыми клубочками зародышей в возрасте 57 суток (27 мм длины), когда в сохранившихся каудальных отделах мезонефроса не наблюдалось признаков дегенерации мезонефронов, и составляет $20,5 \pm 0,44$. Индекс апоптоза клеток сосудистых клубочков увеличился на 25,0% и составляет $40,8 \pm 0,39$. Индекс готовности к апоптозу увеличился на 29,2% и составляет $9,6 \pm 0,35$. Антиапоптотический индекс снизился на 39,5% и составляет $11,2 \pm 0,11$.

ВЫВОДЫ

1. В развитых в конкретный период времени мезонефронах индексы пролиферации и апоптоза составляющих их клеток примерно одинаково высоки. Индекс готовности к апоптозу и антиапоптотический индекс не высоки.

2. В развивающихся мезонефронах индекс пролиферации их клеток очень высок. Антиапоптотический индекс также высок. Индекс апоптоза и готовности к апоптозу находятся на низком уровне.

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

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Сравнительное изучение процессов пролиферации и апоптоза клеток мезонефроса в процессе нефрогенеза первичной и окончательной почки, как единой органной системы, поможет вскрыть закономерности нормальной замены одного органа на другой, нарушающегося при различной патологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Милованов А. П. Внутриутробное развитие человека / А. П. Милованов, С. В. Савельева. – Москва, 2006. – 382 с.
2. Цымбалюк В. И. Нейрогенные стволовые клетки / В. И. Цымбалюк, В. В. Медведев. – К.: «Коваль», 2005. – 596 с.
3. Cell proliferation in the growing human heart: MIB-1 immunostaining in preterm and term infants at autopsy / V. Huttenbach, M. L. Ostrowski, D. Thaller, H. S. Kim // *Cardiovasc. Pathol.* – 2001. – Vol. 10, N 3. – P. 119-123.
4. Cernochova D. Apoptosis and expression of proliferative proteins in the developing nervous system and orofacial region of human embryos / D. Cernochova, E. Pospisilova, D. Nepozitkova et al. // *Gen. Physiol. Biophys.* – 1999. – V. 18 Suppl., N 1. – P. 90.
5. Fesus L. P. Apoptosis; Molecular mechanisms in programmed cell death / L. P. Fesus, J. A. Davis, M. Piacentini // *Europ. J. Cell Biol.* – 1991. – Vol. 747. – P. 195-204.
6. Zusman I. Immune systems and human intrauterine development / Itzhak Zusman, Pavel Gurevich, Herzel Ben-Hur. – Transworld Research Network: Kerala, India, 2008. – 239 p.