

УДК 611. 013. 7/8 + 611 – 018 + 611.24 + 611.611

© Н. И. Майструк, Е. Ю. Шаповалова, 2009.

## ОРГАНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПРОЦЕССОВ ПРОЛИФЕРАЦИИ И АПОПТОЗА КЛЕТОК ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У ЗАРОДЫШЕЙ ЧЕЛОВЕКА ПРИ МАТОЧНОЙ ИМПЛАНТАЦИИ

Н. И. Майструк, Е. Ю. Шаповалова

*Крымский государственный медицинский университет им. С.И. Георгиевского, кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. – профессор Е.Ю. Шаповалова) г. Симферополь, А.Р. Крым, Украина.*

### ORGANIC PECULARITIES OF PROLIFERATION AND APOPTOSIS OF HUMAN EMBRYOS PANCREAS CELLS DURING UTERUS IMPLANTATION

N. I. Maystruk, Ye. Yu. Shapovalova

#### SUMMARY

In 48 human embryos in the age from 21 day to 12 weeks of the intrauterus development, 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 cells of branched pancreas ducts, acini and mesenchyme have been revealed. The ratio of studied cells is correlated with the age of the embryos.

### ОРГАНІ ОСОБЛИВОСТІ ПРОЦЕСУ ПРОЛІФЕРАЦІЇ ТА АПОПТОЗУ КЛІТИН ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ У ЕМБРІОНІВ ЛЮДИНИ ПРИ МАТКОВОЇ ІМПЛАНТАЦІЇ

Н. І. Майструк, Е. Ю. Шаповалова

#### РЕЗЮМЕ

У 48 ембріонів людини, розташованих за віковою шкалою від 21 дня до 12 тижнів внутрішньоутробного розвитку, яка включає X-XXIII стадію і початок плодового періоду (за класифікацією інституту Карнегі) 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 у процесі закладки та розвитку чотирьох розгалужень вивідних протоків та ацинусів підшлункової залози. Отримані різні показники цих індексів у залежності від віку ембріонів людини.

**Ключевые слова:** эмбриональный гистогенез человека, поджелудочная железа, апоптоз, пролиферация.

Программированная смерть клеток была названа апоптозом Kerr (1972) [1]. Апоптоз является морфологическим проявлением реализации внутриклеточной программы самоуничтожения клетки и отличается от других известных форм гибели клетки высокой организацией и четкостью молекулярного каскада реакций [2]. Это общая черта развития большинства тканей и органов человека и млекопитающих. Апоптоз происходит при нормальном пренатальном развитии и важен для поддержания оптимального баланса между старыми нефункционирующими клетками и вновь образованными в результате пролиферации [7]. Гомеостаз и развитие большинства органов у позвоночных регулируется пролиферацией, дифференцировкой и смертью клеток [6]. Сведения об особенностях этих процессов в раннем развитии поджелудочной железы у человека в работах отечественных и зарубежных ученых отсутствуют.

Целью и задачей нашего исследования явилось изучение индекса пролиферации, индекса готовности к апоптозу, индекса апоптоза и антиапоптотического индекса клеток поджелудочной железы в процессе ее раннего развития у зародышей человека, развивавшихся в матке при отсутствии явно выраженных повреждающих факторов внешней и внутренней среды.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Изучены 48 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 поджелудочной железы 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 [4]. 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 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 поджелудочной железы при увеличении  $\times 1350$  с последующим вычислением показателя в процентах в среднем по результатам всех изученных зародышей каждого возраста.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

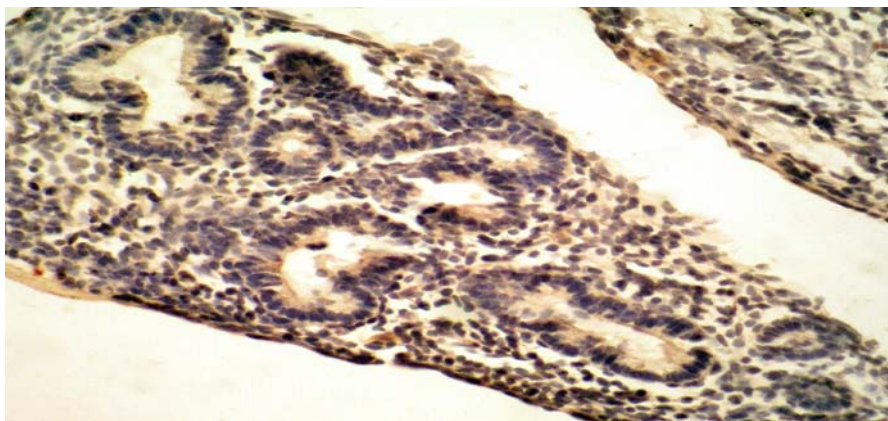
У зародышей 38 суток (10 мм длины) присутствуют дорзальный и вентральный зачатки поджелудочной железы. Дорзальная закладка железы представляет собой эпителиальную трубку, лежащую в брыжейке желудка. Она выстлана изнутри многорядным призматическим эпителием со слабо оксифильной цитоплазмой и овальными крупными ядрами, перпендикулярными к основанию. Индекс пролиферации и апоптоза клеток главного выводного протока дорзальной закладки невысоки и находятся примерно на одном уровне ( $29,7 \pm 0,35$  и  $20,4 \pm 0,22$ ). Антиапоптотический индекс тех же клеток существенно выше и составляет  $30,1 \pm 0,31$ . CD95-позитивные клетки составляют  $10,6 \pm 0,11$ . Базальная мембрана выражена слабо. Дистальный отдел

дорзальной закладки многократно ветвиться, образуя первичные эпителиальные трубки, покрытые многорядным призматическим эпителием. Индекс пролиферации, апоптоза, готовности к апоптозу и антиапоптотический индекс клеток ветвлений протоков первого порядка составляет  $34,4 \pm 0,27$ ;  $18,6 \pm 0,28$ ;  $9,1 \pm 0,13$  и  $39,9 \pm 0,25$  соответственно. По ходу вторичных ветвей в различных направлениях наблюдается образование новых эпителиальных почеч, представляющих собой закладки протоков 2-го порядка. В некоторых из них имеются небольшие просветы, выстланные двурядным кубическим эпителием. Индекс пролиферации, апоптоза, готовности к апоптозу и антиапоптотический индекс клеток ветвлений протоков второго порядка составляет  $39,1 \pm 0,43$ ;  $16,8 \pm 0,12$ ;  $8,3 \pm 0,09$  и  $45,2 \pm 0,38$  соответственно. Высокие показатели индекса пролиферации и антиапоптотического индекса свидетельствует об активном размножении клеток и последующей их дифференцировке [5]. Программа программированной клеточной гибели в эпителии протоков второго порядка разворачивается в небольшом числе клеток. Ближе к концевому отделу дорзальная закладка постепенно суживается. Количество ответвлений 1-го порядка уменьшается вначале до 3-4, затем до 2-х и, наконец, до одного. Вентральная закладка значительно меньших размеров. Она, также как дорзальная, ветвится и имеет протоки 1-го и 2-го порядков.

У зародышей этого возраста обе закладки поджелудочной железы располагаются в уплотняющейся дифференцирующейся мезенхиме брыжейки, ядра клеток которой принимают вытянутую форму и приобретают циркулярное направление. Индекс пролиферации, апоптоза, готовности к апоптозу и антиапоптотический индекс клеток мезенхимы вокруг главного выводного протока дорзальной закладки составляет  $25,7 \pm 0,24$ ;  $16,3 \pm 0,16$ ;  $7,7 \pm 0,14$  и  $27,4 \pm 0,31$  соответственно.

У зародышей в возрасте 45 суток (16 мм длины) окончательно завершается слияние вентрального и дорзального зачатков железы. На левой полуокружности двенадцатиперстной кишки открываются два протока поджелудочной железы: спереди – главный выводной проток дорзальной закладки, а сзади от него – главный выводной проток вентральной закладки. Оба протока выстланы многорядным призматическим эпителием с оксифильной цитоплазмой и светлыми овальными ядрами, образующими 2-3 ряда. Индекс пролиферации и апоптоза этих клеток самый невысокий по сравнению с эпителиоцитами других выводных протоков железы зародышей этого возраста и составляет  $22,6 \pm 0,21$  и  $21,4 \pm 0,18$ . От главных выводных протоков закладок отходят в различных направлениях многочисленные ответвления протоков 1-го и 2-го порядков. По направлению к хвостовому

отделу железы количество вторичных ответвлений главного протока дорзальной закладки постепенно уменьшается до 5-3-х и, наконец, до одного. Стенка протоков 1-го и 2-го порядков выстлана двух- трёхрядным призматическим эпителием. Его клетки оксифильны. Индекс пролиферации, апоптоза, готовности к апоптозу и антиапоптотический индекс эпителиоцитов выводных протоков 1-го и 2-го порядков составляет  $32,0 \pm 0,45$ ;  $19,1 \pm 0,35$ ;  $10,3 \pm 0,24$  и  $39,3 \pm 0,24$  соответственно. Обнаруживаются третичные ответвления выводных протоков в виде эпителиальных почек, отходящих от вторичных ответвлений и внедряющихся в окружающую мезенхиму брыжеек. Они представлены тяжами эпителиальных клеток без просвета, имеющих высокий индекс пролиферации ( $38,9 \pm 0,33$ ) и антиапоптотический индекс ( $46,1 \pm 0,29$ ). Клетки этих закладок слабо подвержены апоптозу: индекс апоптоза –  $15,7 \pm 0,31$  и индекс готовности к апоптозу –  $8,9 \pm 0,22$ . Характерной особенностью развития поджелудочной железы у зародышей в возрасте 60 суток (30 мм длины) является усиление формообразовательных процессов. Ростковые концы эпителиальных трубок удлиняются, образуя новые железистые трубки. Так появляются внутридольковые протоки 4-го порядка. Они представляют собой эпителиальные почки, которыми слепо заканчиваются многочисленные выводные протоки 3-го порядка. Они образованы призматическими клетками со слабо базофильной цитоплазмой и крупными ядрами, располагающимися у базальной мембраны. Очень высокий антиапоптотический индекс ( $46,7 \pm 0,24$ ) и высокий индекс пролиферации ( $38,5 \pm 0,39$ )



**Рис. 1. Плодный период. Зародыш в возрасте 60 суток (30 мм длины). Клетки в состоянии апоптоза в эпителии вторичных и третичных выводных протоков и окружающей мезенхиме поджелудочной железы. Окраска p-53 с докраской ядер гематоксилином. Визуализация в системе En vision . Увеличение: об. 40, ок. 10.**

При изучении гистологических препаратов зародышей 9-10 недель (33-45 мм длины) впервые отмечается начало формирования концевых секреторных отделов поджелудочной железы. На дистальных концах протоков 4-го порядка выявляются эпителиальные почки, которые имеют грушевидную форму и представляют собой зачатки ацинусов. Эти зачатки состоят из плотно лежащих кубических клеток

свойственны этим клеткам, что свидетельствует об активных процессах формообразования и дифференцировки. Клетки этих закладок слабо подвержены апоптозу: индекс апоптоза –  $15,9 \pm 0,18$  и индекс готовности к апоптозу –  $8,5 \pm 0,11$ . Эпителиальная выстилка первичных, вторичных и третичных ответвлений главного выводного протока железы представлена двухрядным призматическим эпителием. Клетки базального ряда оксифильны, тесно прилежат друг к другу. Индекс пролиферации, апоптоза, готовности к апоптозу и антиапоптотический индекс эпителиоцитов выводных протоков 1-го – 3-го порядков составляет  $24,6 \pm 0,24$ ;  $22,7 \pm 0,36$  (рис. 1);  $12,5 \pm 0,20$  и  $33,8 \pm 0,21$  соответственно.

Главный выводной проток поджелудочной железы образовался при слиянии закладок органа. Проксимальный отдел его располагается в заднем сегменте головки железы. Он развился из вентральной закладки. Из дорзальной закладки развился дистальный отдел главного протока, лежащий в теле и хвосте железы. Эпителий главного выводного протока высокий призматический с двух-, иногда трехрядным расположением ядер.

Все изученные индексы здесь самые низкие, что, возможно, связано с ослаблением процессов формообразования и дифференцировки. Индекс пролиферации, апоптоза, готовности к апоптозу и антиапоптотический индекс эпителиоцитов главного выводного протока составляет  $19,5 \pm 0,31$ ;  $18,6 \pm 0,17$ ;  $10,2 \pm 0,15$  и  $20,1 \pm 0,24$  соответственно.

со слабо базофильной цитоплазмой. Очень высокий антиапоптотический индекс ( $46,2 \pm 0,29$ ) и высокий индекс пролиферации ( $37,9 \pm 0,34$ ) насчитывается среди этих клеток, что свидетельствует об активных процессах формообразования и дифференцировки. Клетки этих закладок слабо подвержены апоптозу: индекс апоптоза –  $16,7 \pm 0,22$  и индекс готовности к апоптозу –  $10,2 \pm 0,14$ . В расположении эпителиальных

структур железы ясно видна дольчатость. Внутريدольковые выводные протоки 2-го, 3-го и 4-го порядков и междольковые выводные протоки, являющиеся первичными ответвлениями главного выводного протока присутствуют в поджелудочной железе. Главный выводной проток железы на всем протяжении внутрижелезистой части, расположен-

ной в заднем сегменте головки и в области тела, имеет единый канал.

Он выстлан изнутри двухрядным призматическим эпителием, который в области головки становится однорядным призматическим. Среди эпителиоцитов продолжается снижение всех изученных индексов (рис. 2).

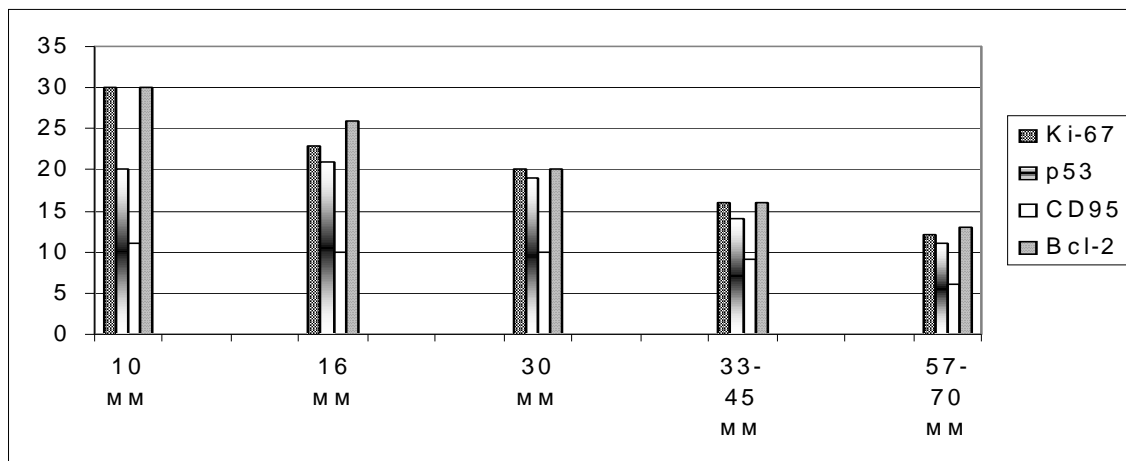


Рис. 2. Индекс пролиферации (Ki-67-позитивные клетки), апоптоза (p53-позитивные клетки), индекс готовности к апоптозу (CD95-позитивные клетки) и антиапоптотический индекс (Bcl-2-позитивные клетки) эпителиоцитов главного выводного протока поджелудочной железы.

Вокруг новообразованных на концах протоков 4-го порядка ацинусов происходит ускоренное, по сравнению с другими участками, развитие эмбриональной соединительной ткани. Самый высокий среди клеток эмбриональной соединительной ткани поджелудочной железы антиапоптотический индекс ( $33,9 \pm 0,25$ ) и индекс пролиферации ( $33,4 \pm 0,22$ ) свойственны этим клеткам, что свидетельствует об активных процессах формообразования и дифференцировки. Клетки этих закладок слабо подвержены апоптозу: индекс апоптоза –  $11,5 \pm 0,12$  и индекс готовности к апоптозу –  $7,8 \pm 0,12$ .

#### ВЫВОДЫ

1. В эпителии главного выводного протока поджелудочной железы по мере взросления зародышей индекс пролиферации и антиапоптотический индекс постепенно снижаются, но остаются заметно выше, чем индекс апоптоза и готовности к апоптозу.

2. В эпителии вновь появившихся закладок выводных протоков и ацинусов и мезенхиме вокруг них присутствует высокий индекс пролиферации и антиапоптотический индекс составляющих их клеток. Индекс апоптоза и готовности к апоптозу низкие.

3. В эпителии главного выводного протока поджелудочной железы насчитываются самые низкие показатели изученных индексов, по сравнению с эпителием других имеющихся выводных протоков.

4. В эпителии сформировавшихся протоков, по сравнению с эпителием вновь появившихся протоков

индекс пролиферации и апоптоза его клеток примерно одинаковы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Милованов А. П. Внутритрубное 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. 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.
5. LeBrun D. P. Expression of Bcl-2 in fetal tissues suggests a role in morphogenesis / D. P. LeBrun, R. A. Warnke, M. L. Cleary // *Am J Pathol.* – 1993. – Vol. 142, N 3. – P. 743-753.
6. Prochazkova J. Involvement of p53 and Bcl-2 family proteins in regulating programmed cell death and proliferation in human embryogenesis / J. Prochazkova, V. Lichnovsky, D. Kylarova // *Gen Physiol Biophys* – 2004. – Vol. 23, N 2. – P. 209-229.
7. Zusman I. Immune systems and human intrauterine development / Itzhak Zusman, Pavel Gurevich, Herzel Ben-Hur. – Transworld Research Network: Kerala, India, 2008. – 239 p.