

ДИНАМИКА УРОВНЯ АПОПТОЗА В ГОМОГЕНАТЕ КУРИНОГО ЗАРОДЫША ВО ВЗАИМОСВЯЗИ С АБСОЛЮТНЫМ ПРИРОСТОМ МАССЫ ТЕЛА В ПРОЦЕССЕ ЭМБРИОГЕНЕЗА*

Аннотация. Установлена волнообразная изменчивость уровня апоптоза на протяжении всего эмбрионального развития, а также взаимосвязь между апоптотическим индексом и абсолютным приростом массы куриных зародышей, характер которой разнообразен на протяжении всего периода эмбрионального развития.

Ключевые слова: апоптоз, куриный эмбрион, эмбриогенез, абсолютный прирост массы.

Изучение программированной клеточной смерти (апоптоза) в последние годы привлекает внимание широкого круга исследователей как медицинского, так и биологического профиля. Этот интерес связан с тем, что, несмотря на большое количество экспериментальных данных, до сих пор не раскрыты до конца механизмы этого явления, не до конца выяснены особенности регуляции и индукции апоптоза отдельных клеток в целостном организме [5].

В настоящее время апоптоз определяют как высокорегулируемую форму программированной смерти клетки с характерными морфологическими и биохимическими признаками [10]. Клетки, подвергающиеся такой гибели, активно используют генетически контролируемую программу, нацеленную на собственную гибель, совершая тем самым своего рода суицид [9].

Запрограммированная гибель клетки – неотъемлемая и важная часть эмбрионального периода развития. Известно, что в развивающемся зародыше обязательно присутствуют клетки с морфологическими признаками апоптотической гибели, которая вовлечена в процессы их элиминации клеток, формирование тканей, канализации протоков, формирование пальцев конечностей [4]. Имеется разрозненная информация об уровне апоптоза в различных органах и тканях, таких, как сердце, глаз млекопитающих, нервная ткань в отдельные периоды пренатального онтогенеза [8; 2; 11]. Однако отсутствует системный подход к оценке динамики этого интегративного критерия на протяжении всего эмбрионального периода онтогенеза.

Особенностью эмбриогенеза являются постоянные преобразования организма, сопровождающиеся высокой интенсивностью изменения морфометрических показателей, таких, как увеличение органов, линейных размеров тела, прибавление массы зародыша и др. Такого рода морфометрические изменения организма можно определить одним термином – рост, который характеризует ряд показателей, отражающих изменение линейных размеров и массы тела: абсолютные показатели, абсолютный и относительный приросты и т.д. Данные изменения осуществляются за счет высокой интенсивности процессов дифференцировки, пролиферации и программированной клеточной гибели.

На наш взгляд, одним из важных критериев, описывающих рост и развитие эмбриона, является абсолютный прирост массы на определенной стадии развития по отношению к предыдущим суткам. Этот показатель непосредственно связан с изменением количества клеток в отдельных тканях и органах, которое зависит не только от уровня пролиферации, но и от интенсивности апоптоза. Однако в доступной отечественной и

* © Тимченко Л.Д., Блажнова Г.Н., Пономаренко А.П.

зарубежной литературе нам не удалось найти данных, описывающих взаимосвязь интенсивности апоптоза с абсолютным приростом массы тела в пренатальном периоде онтогенеза. По нашему мнению, такого рода исследования могут иметь прогностическое значение с целью направленного регулирования соматического эмбриогенеза.

Наиболее удобной биологической моделью для исследования любых показателей в эмбриогенезе, в том числе апоптоза и абсолютного прироста массы тела, по нашему мнению, является куриный эмбрион. Это обусловлено тем, что работа с ним, в отличие от работы с эмбрионами млекопитающих, может быть реализована на каждые сутки развития, он является доступным, легко управляемым объектом исследования и в тоже время максимально изолирован от влияния факторов окружающей среды.

В связи с вышеизложенным, целью нашего исследования явилось изучение динамики уровня апоптоза в тканях куриного эмбриона во взаимосвязи с абсолютным приростом массы тела на протяжении всего эмбриогенеза. Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

- 1) изучить динамику апоптотического индекса у куриного эмбриона на протяжении всего эмбриогенеза (с 1-х по 20-е сутки развития);
- 2) исследовать абсолютный прирост массы;
- 3) выявить взаимосвязь между апоптотическим индексом и абсолютным приростом массы зародыша.

Ранние стадии эмбриогенеза характеризуются минимальными размерами органов, что осложняет возможность выделения структурных элементов с целью получения достоверных показателей интенсивности апоптоза в них, поэтому в процессе исследования использовали гомогенат куриного зародыша. Изучение уровня апоптоза в гомогенате позволяет определить уровень апоптоза не в отдельной ткани, а вычислить средний апоптотический индекс организма в целом.

В ходе экспериментальной работы уровень апоптоза в гомогенате куриного зародыша определяли на каждые сутки инкубации по методике Абдувалиева А.А., Гильдиевой М.С. [1]. Апоптотический индекс (АИ) считали по формуле, предложенной M.D. Logsdon, R.E. Meyn, P.C. Besa et al [7]:

$AI = N_m / N \times 100$, где N_m – количество апоптотических клеток, N – общее количество клеток в исследуемой совокупности.

Вычисляли абсолютный прирост массы (АПМ) тела эмбрионов на разных стадиях развития по формуле, предложенной Шмальгаузенем И.И. [6]:

$$A = W_1 - W_0 / t,$$

где A – абсолютный прирост, W_1 – масса тела на определенной стадии развития, W_0 – масса тела на предыдущей стадии развития, t – изучаемый период развития (сутки развития).

Установлено, что запрограммированная гибель клеток у птиц присутствует на протяжении всего эмбриогенеза. Динамика апоптотического индекса на этой стадии онтогенеза не постоянна, имеет волнообразный характер, со сменой пиков подъема и спада. При этом отмечено шесть пиков подъема – 5-е сутки развития ($31,3 \pm 0,03\%$), 7-е сутки ($25,1 \pm 0,02\%$), 11-е сутки ($26,7 \pm 0,03\%$), 14-е сутки ($14,7 \pm 0,04\%$), 17-е ($17,9 \pm 0,07\%$) и 20-е сутки развития ($12,3 \pm 0,04\%$). Пики спада апоптотического индекса в тканевом гомогенате приходятся на 6-е сутки ($17,7 \pm 0,02\%$), 9-е сутки ($7,21 \pm 0,03\%$), 13-е сутки ($11,8 \pm 0,09\%$), 16-е сутки ($6,71 \pm 0,01\%$) и 18-е сутки ($0,951 \pm 0,004\%$). При этом максимальное значение апоптотического индекса отмечено на 5-е сутки ($31,3 \pm 0,03\%$), а минимальное зафиксировано на 18-е сутки исследования и составило $0,95 \pm 0,004\%$.

При вычислении абсолютного прироста массы тела куриных зародышей на протяжении всего эмбрионального периода развития, так же, как и при исследовании апоптического индекса, было зафиксировано неоднократное чередование повышения и понижения уровня данного показателя. При этом наименьшее значение абсолютного прироста было отмечено на 3-и сутки развития ($0,0081 \pm 0,0003$ г), а максимальное было зафиксировано на 16-е сутки развития ($0,36 \pm 0,04$ г).

При сопоставлении кривых, представленных на рис. 1, был отмечен разный характер взаимосвязи динамики изменения апоптического индекса и абсолютного прироста массы зародышей. Например, на 5, 7, 10 и 14-е сутки развития отмечено одновременное увеличение АИ и АПМ; на 8, 13, 15-е сутки был зафиксирован как спад АИ, так и спад АПМ эмбрионов; на 11 и 17-е сутки отмечено увеличение АИ и спад АПМ; на 6, 9, 12, 16, 18-е сутки зафиксировали спад АИ и одновременное увеличение АПМ.

Таким образом, нами установлена зависимость между такими показателями, как АИ и АПМ тела куриных зародышей, характер которой изменчив на протяжении эмбрионального онтогенеза. По нашему мнению, это может быть связано с разнообразием и соотношением регуляторных механизмов в эмбриогенезе, вступающих в действие на различных его этапах. Их качественная и количественная изменчивость обуславливает появление установленной нами при изучении АИ и АПМ тела зависимости, проявляющейся в пиках подъема и спада. Такие пики, по мнению А.К. Макарова [3], можно считать критическими по отношению к исследуемым в онтогенезе параметрам.

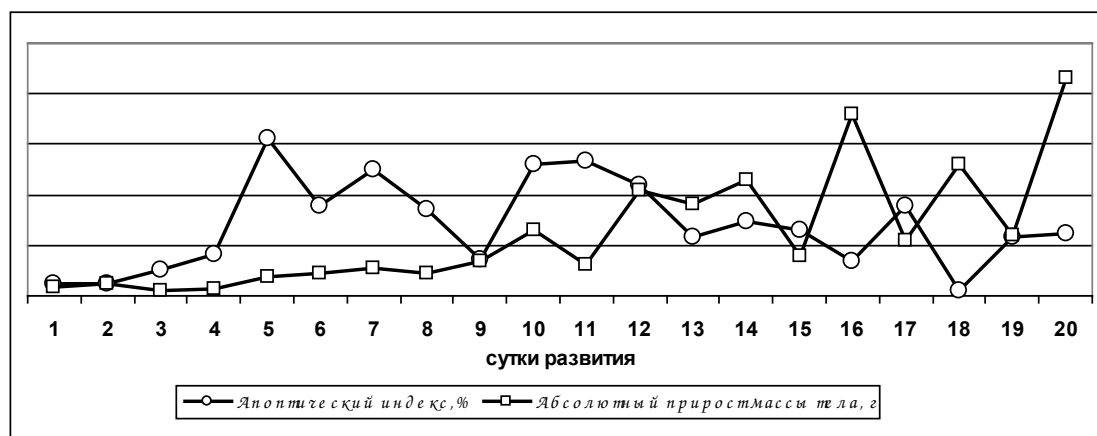


Рис. 1. Взаимосвязь апоптического индекса с абсолютным приростом массы тела куриных эмбрионов

Для анализа возможных причин, обуславливающих закономерность полученных взаимосвязей, в качестве примера нами рассмотрены четыре критических срока пренатального развития, когда отмечено повышение уровня АИ и одновременное повышение АПМ зародышей.

Так, например, на 5-е сутки развития, по нашему мнению, такая динамика, общая для обоих показателей, обусловлена активными пролиферативными процессами всех тканевых компонентов эмбриона, а также нарастанием уровня дифференцировки, что сопровождается интенсивным органогенезом. В этот период эмбриогенеза происходит формирование четырехкамерного сердца, дифференциация селезенки, зачатков конечностей, Фабрициевой сумки, закладывается тимус, и именно на этой стадии эмбриогенеза начинается продукция зрелых эритроцитов.

На 7-е сутки развития совпадение динамики АИ с динамикой АПМ тела куриных зародышей сопровождается половой дифференциацией, образованием петли двенадца-

типерстной кишки, удлинением кишечной трубки, формированием кисти, стопы и воздухоносной камеры. На этом этапе, наряду с продолжающимися пролиферативными процессами, нарастает и уровень дифференцировки в уже образовавшихся органах и тканях, что закономерно сопряжено с некоторым снижением уровня АИ по сравнению с пятью сутками.

На фоне предыдущих суток развития (9-х и 8-х), где АИ снижался, на 10-е сутки данный показатель резко увеличился. Такое нарастание АИ с одновременным увеличением АМП тела, по нашему мнению, обусловлено активной дифференцировкой стоп и пальцев конечности, формированием скелетной мускулатуры, регрессией Мюллеровых протоков. Это, безусловно, сопряжено с инициацией апоптоза, что подтверждено на графике пиком подъема данных показателей.

На 14-е сутки эмбрионального развития наблюдается инволюция первичной почки, а постоянная почка дифференцируется. Печень достигает максимального размера. В красном костном мозге начинается гемопоэз, в связи с чем пролиферация в нем протекает более интенсивно. Кроме того, в этом периоде эмбриогенеза наблюдается увеличение массы как органов, так и организма в целом. На наш взгляд, такая динамика одновременного повышения АИ и АПМ обусловлена активной дифференцировкой, а также продолжающимися пролиферативными процессами в отдельных органах и тканях, сопряженных с апоптозом.

Таким образом, по результатам экспериментальной работы нами установлена волнообразная изменчивость уровня апоптоза на протяжении всего эмбрионального развития, а также взаимосвязь между апоптотическим индексом и абсолютным приростом массы куриных зародышей, характер которой разнообразен на протяжении всего периода эмбрионального развития.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Абдувалиев А. А. Дифференциальное окрашивание опухолевых клеток трипановым синим для определения апоптоза / А. А. Абдувалиев, М. С. Гильдиева // Клиническая лабораторная диагностика. – 2006. – № 2. – С. 36-38.
2. Данилов Р.К. Развитие нервно-мышечных взаимодействий в онтогенезе позвоночных и человека / Р.К. Данилов, А.Г. Маннапов // Успехи современной биологии. – 1990. – Т. 110. – С. 134-140.
3. Макаров А.К. Циклическая изменчивость органов и критические периоды жизни человека / А.К. Макаров // Актуальные вопросы медицины: сб. науч. трудов «Новые технологии в стоматологии». – Ставрополь: Изд. СГМА, 1996. – С. 65-69.
4. Светлаков А.В. Апоптоз в преимплантационном эмбриогенезе (обзор литературы) / А.В. Светлаков, М.В. Яманова, А.Б. Салмина // Проблемы репродукции. – 2002. – № 5. – С. 15-23.
5. Суханова Г.А. Апоптоз / Г.А. Суханова, О.Е. Акбашева. – Томск: Изд-во ТПУ. – 2006.
6. Шмальгаузен И.И. Рост и дифференцировка / И.И. Шмальгаузен. – Киев: Наукова думка, 1984. – Т. 1.
7. Logsdon M.D. Apoptosis and the Bcl – 2 gene family – patterns of expression and prognostic value in stage I and II follicular center lymphoma / M.D. Logsdon, R.E. Meyn, P.C. Besa et al. // Int. of Radiat. Oncol. Biol. Phys. – 1999. – V. 44. – P. 19-29.
8. Pexider A.G. / Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol. – 1975. – Vol. – 1. – P. 100.
9. Que F.G. Cell death by apoptosis / F.G. Que, G.J. Gores // Gastroenterol. – 1996. – Vol. 110. – P. 1-6.
10. Thompson C.B. Apoptosis in the pathogenesis of disease / C.B. Thompson // Sci. – 1995. – Vol. – 267. – P. 1456-1462.
11. Silver J / J. Morphol. // J. Silver., A.F. Hughes. – 1973. – Vol. 40. – P. 159-170.

L. Timchenko, G. Blajnova, A. Ponomarenko

DYNAMICS OF LEVEL APOPTOSIS IN HOMOGENATE A CHICKEN GERM IN INTERRELATION WITH A PURE GAIN OF WEIGHT OF A BODY IN PROCESS EMBRYOGENESIS

Abstract. Wavy variability of level apoptosis throughout all embryonal developments, and also interrelation between apoptosis an index and a pure gain of weight of the chicken germs which character is various throughout all period embryonal developments is established.

Key words: apoptosis, a chicken embryo, embryogenesis, a pure gain of weight of a body.