

МОРФОМЕТРИЯ

УДК 612.35.014.2-053.1

Ю.А. Петренко, Д.В. Грицай, Т.П. Говоруха, Н.В. Репин, А.Ю. Петренко

МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА ФЕТАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ ЧЕЛОВЕКА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков)

Работа выполнена при поддержке гранта УНТЦ №4419.

Вступление. Печень является органом с широким функционально-метаболическим профилем. Главное ее назначение во взрослом организме – трансформация питательных веществ и токсинов в такие формы, которые, с одной стороны, могут быть использованы для жизнедеятельности, а с другой – подвергнуты экскреции. В то же время в период внутриутробного развития печень выполняет в основном синтетическую и кроветворную функции.

В первом триместре пренатального развития человека печень содержит клетки различных типов, среди которых, в первую очередь, следует отметить гемопоэтические, гепатические и мезенхимальные [12]. Более точный клеточный состав эмбриональной печени, а также уровень дифференцированности и соотношение клеток различного фенотипа, формирующих этот орган, до настоящего времени остаются недостаточно изученными.

В связи с этим целью настоящей работы явилось исследование клеточного состава фетальной печени человека методами световой и электронной микроскопии.

Объект и методы исследования. Фрагменты печени плодов человека 8-10 недель гестации были получены после хирургического прерывания беременности по “социальным” показаниям после письменного согласия донора. Суспензию клеток эмбриональной печени получали в стерильных условиях неферментативным методом [15], модифицированным для малых объемов, разводили солевым раствором Дюльбекко (Sigma, США), фильтровали и пропускали через иглы уменьшающегося диаметра (19G – 25G).

Для гистологических и электронно-микроскопических исследований суспензию клеток или фрагменты фетальной печени

человека фиксировали в 2 %-ном растворе глутарового альдегида, приготовленного на фосфатном буфере (рН 7,4) при 0-4 С в течение 2 час. Затем материал промывали в фосфатном буфере и постфиксировали в 1 %-ном растворе четырехоксида осмия на фосфатном буфере в течение 1 час. После фиксации образцы промывали в фосфатном буфере, обезжировали в ацетоне восходящей концентрации (схема проводки: 50 %, 70 %, 85 %, 96 % - по 10 мин, 100 % - дважды по 10 мин) и пропитывали смесью эпон аралдит. Затем образцы помещали в полиэтиленовые ампулы с заливочной смолой и полимеризовали в течение 24 час при температуре 60°C. В оптическом микроскопе исследовали полутонкие срезы толщиной 0,5 мкм, полученные с образцов печени, подготовленных для изучения в электронном микроскопе. Полутонкие срезы получали на ультрамикротоме УМТП-7, окрашивали метиленовым синим и толуидиновым синим, просматривали на микроскопе МБР-3, снабженном цифровой видеокамерой Panasonic WV-CP 470. Ультратонкие срезы контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата и раствором цитрата свинца по Рейнольдсу. Ультраструктуру клеток печени исследовали с помощью электронного микроскопа ПЭМ-125К при ускоряющем напряжении 75 kV, снабженного системой съема и анализа изображения САИ - 01А (АО “SELM”, г. Сумы) на основе CCD камеры DX-2 и пакета программ фирмы «КАРРА», Германия.

Полученные результаты обрабатывали статистически на персональном компьютере, используя пакет программ Excel и Statistica. В зависимости от характера распределения данных использовали параметрический метод статистического анализа (t критерий Стьюдента) или непараметрический - Манна-Уитни [2].

Результаты исследований и их обсуждение. Гистологическое исследование фетальной печени человека 8-10 недель гестации свидетельствует о высокой гетерогенности клеточного состава образцов (рис. 1). В пре-

паратах присутствовали, в основном, клетки гемопоэтического и гепатического ростков, значительно реже - эндотелиальные клетки, формирующие синусоидальные капилляры, а также фибробластоподобные клетки.

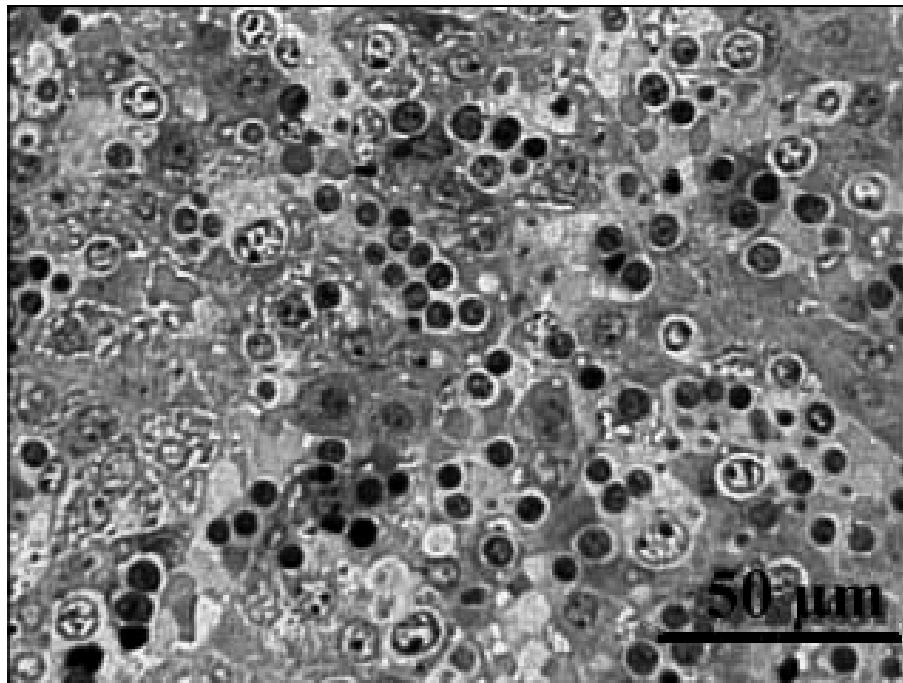


Рис.1. Гистология печени плодов человека 8-10 недель гестации.

Морфометрический анализ нативной фетальной печени показал примерное соотношение основных морфологически различимых типов клеток (табл.). Так, общее количество

эритроидных клеток (эритробластов, проэритробластов и ретикулоцитов) превышало 81% общей клеточной популяции.

Таблица

Клеточный состав нативной фетальной печени человека, оцененный с помощью морфометрического анализа, n=5

	Гепатические клетки	Эритробласты ¹	Проэритробласты	Ретикулоциты
Кол-во, %	18 ± 4,7%	49,8 ± 6,4%	10,5 ± 1,7%	21,7 ± 5,2%

Примечание: ¹ – суммарное количество орто-, полихроматофильных, а также базофильных эритробластов.

Большинство из них составляли базофильные, орто- и полихроматофильные эритробласты (49,8 ± 6,4%), морфологически не различимые друг от друга. Количество ранних эритроидных предшественников (проэритробластов) составляло 10,5 ± 1,7%, а более коммитированных ретикулоцитов – 21,7 ± 5,2%. Клетки гепатического ряда составляли всего 18 ± 4,7.

Электронно-микроскопическое исследование позволило более точно определить клеточной состав фетальной печени человека. На рис.2 показано, что среди эритроидных клеток и клеток гепатического ряда (Г), в образцах присутствуют и эндотелиальные

клетки (Эк), не обнаруженные ранее при гистологическом исследовании. Эритроидные клетки представлены в основном эритроидными предшественниками (эритробластами) различной степени зрелости, отличающиеся размерами и морфологией. Наиболее примитивные предшественники эритроцитов – проэритробласты (ПЭ), превосходящие по размерам все клетки эритроидного ряда, встречаются достаточно редко (рис. 2). Отличительной особенностью данных клеток является резко выраженная базофилия цитоплазмы и нежносетчатая структура ядра, содержащая 2-3 ядрышка.

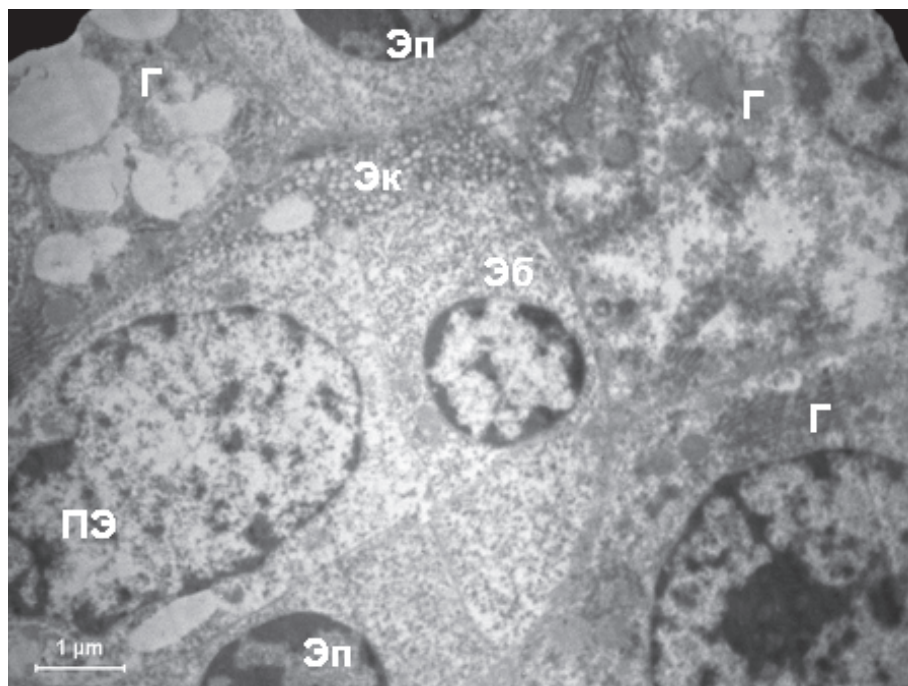
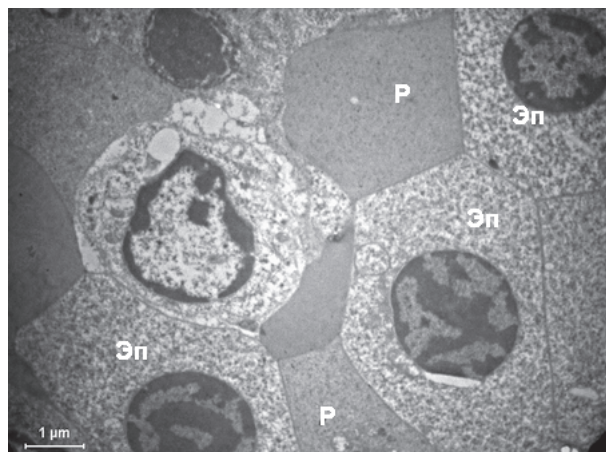


Рис. 2. Структура фетальной печени с типичными представителями печеночных и эритроидных клеток.

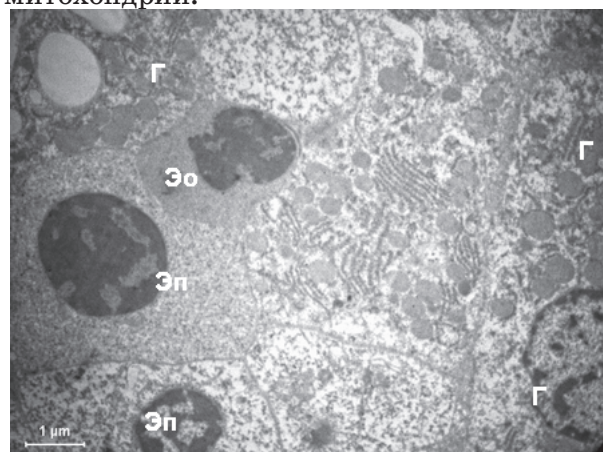
Обозначения: ПЭ – проэритробласт, Эк – эндотелиальная клетка, ЭБ, Эп – эритробласты различной степени зрелости, Г – гепатические клетки.

Ядра базофильных эритробластов (ЭБ) - крупные, округлой формы с характерным распределением хроматина в виде больших глыбок (рис. 2). Цитоплазма базофильных эритробластов содержит большое количество рибосом, что свидетельствует о высокой активности синтетических процессов в печени эмбрионов человека 1-го триместра гестации. В то же время митохондрии немногочисленны и слабо развиты; они характеризуются короткими кристами и матриксом средней электронной плотности.

Полихроматофильные эритробласты (Эп) отличаются от базофильных меньшими размерами ядер, их большей гетерохроматизацией и отсутствием ядрышка (рис. 3А). Последующая дифференцировка эритроидных клеток сопровождается увеличением электронной плотности цитоплазмы, что свидетельствует об увеличении содержания гемоглобина, а также пикнозом и смещением ядра к плазматической мембране. Эти клетки - ортохроматические эритробласты (Эо) показаны на рис. 3Б. Их цитоплазма еще содержит многочисленные рибосомы и несколько митохондрий.



А

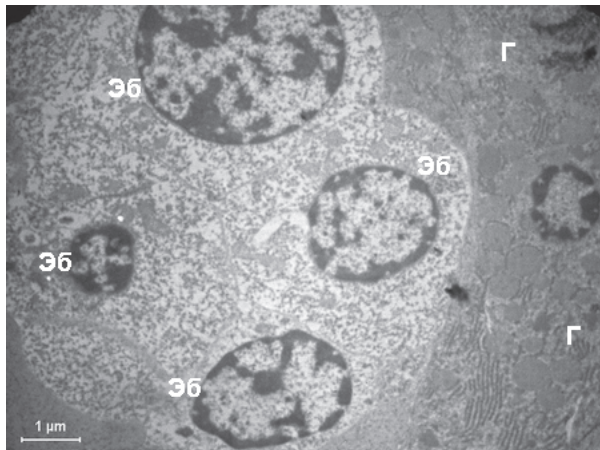


Б

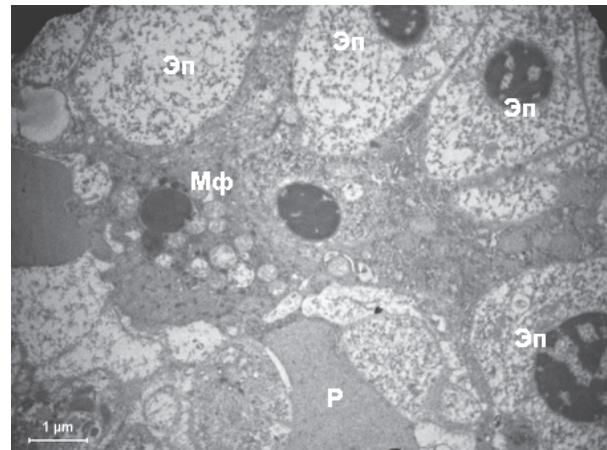
Рис. 3. Ультраструктура полихроматофильных эритробластов (Эп), ортохроматических эритробластов (Эо) и ретикулоцитов (Р) фетальной печени.

Наиболее дифференцированные потомки эритроидных клеток в фетальной печени человека - ретикулоциты (Р), характеризуются отсутствием ядра, высоким содержанием гемоглобина в цитоплазме, что обуславливает их высокую электронную плотность, а также сохранением рибосом (рис.3А). Обращает на себя внимание практически полное отсутствие зрелых форм эритроцитов.

Рассматривая локализацию эритроидных клеток в фетальной печени следует отметить,



А



Б

Рис.4. Локализация эритробластов в фетальной печени человека: А - островок базофильных эритробластов (Эб), Б – островок эритробластов (Эп) с центральным макрофагом (Мф).

На рис. 4Б представлены островки полихроматофильных эритробластов (островки Бэсиса), содержащие центральный макрофаг, активный в фагоцитозе эксфузированных ядер эритробластов. Существует мнение [5], что «центральные» макрофаги играют существенную роль в созревании эритроидных клеток. Результаты настоящего раздела не могут свидетельствовать в пользу этого мнения, так как число «центральных» макрофагов незначительно, по сравнению с количеством эритроидных клеток. Данное противоречие может объясняться участием макрофагов в эритропоэзе лишь в течение лимитированного периода времени, или же их способностью к секреции определенных ростовых факторов, необходимых для полноценного развития эритроидных клеток. Наши данные коррелируют с исследованием [17], в котором на различных стадиях развития печени удавалось идентифицировать лишь небольшое количество описанных эритробластных островков.

Обращает на себя внимание тот факт, что эритроидные предшественники представляют собой подавляющее большинство гемопоэтических клеток в фетальной печени человека 1-го триместра гестации. Эти данные соответствуют результатам проведенной нами работы [16], в которой методом про-

что эритробласты наблюдаются как внутри синусоида, так и вне капилляров синусоидальной сети печени, образуя островки среди гепатических клеток (рис. 4А). На данном этапе формирования печени, взрослеющие островки эритробластов быстро расширяются и достигают синусоидальной стенки, которая в последствии разрушается, что способствует выводу зрелых эритроидных клеток в синусоиды и циркулирующую кровь [1,17].

точной цитофлуориметрии, было показано присутствие в фетальной печени 8-10 недель гестации около 90% эритроидных клеток, экспрессирующих Gly-A антиген. Данный антиген присутствует на всех клетках эритропоэза и не отражает степень их дифференцировки. Эритроидные клетки различной степени зрелости могут быть идентифицированы по экспрессии маркеров CD36, CD41, CD43, CD71, CDw75 [17]. На основании морфологических характеристик, приведенных в настоящем разделе, продемонстрирована своего рода модель эмбрионального эритропоэза, отражающая иерархию эритроидных предшественников в процессе клеточного созревания в фетальной печени человека.

Лимфоидные клетки в фетальной печени человека 1-го триместра развития обнаруживаются достаточно редко, что обусловлено отсутствием зрелых Т- и В-лимфоцитов, составляющих большинство гемопоэтических ядерных клеток периферической и пуповинной крови, а также костного мозга. Из рис. 3, 5 видно, что лимфоидные клетки характеризуются крупным ядром с прилегающим к нему тонким ободком цитоплазмы. Именно такому описанию соответствует стволовая кроветворная клетка [8].

Известно, что важнейшую роль в поддержании кроветворной функции является

специфическое микроокружение, которое формируется стромальными клетками. Данные клетки секретируют ряд ростовых факторов и цитокинов (GM-CSF, SCF, IL-6, IL-9, EPO и др.), участвующих в регуляции пролиферации и дифференциации стволовых клеток и их коммитированных предшественников [20]. В фетальной печени, клетками специфического микроокружения являются гепатические и эндотелиальные клетки, образующие синусоидальные капилляры, а также мезенхимальные клетки.

Эндотелиальные клетки (Эк) или эндотелиоциты выстилают эндотелий синусоидальных капилляров. Из **рис.2** видно, что Эк представляют собой уплощенные клетки с большими порами и фенестрами в периферических отростках. Цитоплазма эндотелиальных клеток содержит большое количество пиноцитарных везикул, в ней обнаруживаются единичные митохондрии с плотным матриксом и короткими кристами, а также микротрубочки и филаменты. Эк оказывают существенное влияние на процесс кроветворения в фетальной печени, поскольку секретируют IL-1, фактор некроза опухоли (tumor necrosis factor, TNF- α), и GM-CSF (колониестимули-

рующий фактор – гранулоцитов, макрофагов) [3, 19]. Однако выработкой цитокинов и факторов роста, очевидно, не ограничивается действие этих клеток на гемопоэз. Показано [13], что при совместном культивировании эндотелиальных и кроветворных клеток из CD34⁺-позитивных клеток образуются как миелоидные, так и эритроидные колонии, в то время как замена эндотелиоцитов на кондиционированную ими среду приводит к образованию только миелоидных колоний. Таким образом, для образования колоний всех ростков кроветворения необходимо непосредственный контакт гемопоэтических клеток-предшественников с эндотелиоцитами.

Гепатические клетки в печени эмбрионов 1-го триместра гестации располагаются в виде эпителиальных тяжей и групп из 3-4 клеток, окруженных формирующимися синусоидными капиллярами. Полярная организация строения этих клеток, свойственная дифференцированным гепатоцитам, еще не выражена. Форма этих клеток полигональная либо неправильная многоугольная. Ядро округлое или овальное с диффузно рассеянным хроматином и 1-2 ядрышками глобулярно-фибриллярной природы (**рис.5**).

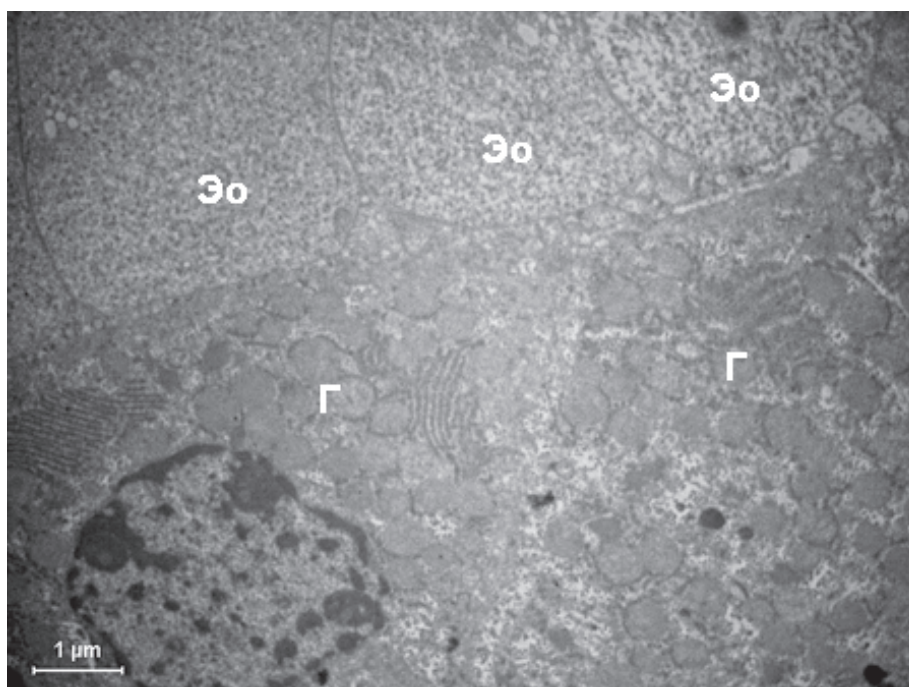


Рис. 5. Ультраструктура гепатических клеток (Г) фетальной печени человека, контактирующих с эритробластами (Эо).

В цитоплазме гепатических клеток равномерно распределены округлые митохондрии с матриксом низкой электронной плотности и несколькими беспорядочно ориентированными кристами. Эндоплазматический ретикулум (ЭПР) представлен рядами узких,

параллельных канальцев, содержащих рибосомы на мембранах. Наблюдается топологическая связь митохондрий с окружающими их цистернами гранулярного ЭПР (**рис. 5**). Комплекс Гольджи располагается вблизи ядра в виде мелких пузырьков. В цитоплаз-

ме, в основном, в ее периферических частях, содержатся мелкие первичные лизосомы, а также единичные капли липидов.

Из рис.3Б и 5 видно, что цитоплазма эритробластов и гепатических клеток в ряде случаев образует десмосомоподобные контакты, что свидетельствует о возможном участии последних в развитии гемопоэтических клеток (рис. 5). В настоящее время считается общепринятым, что основную роль в поддержании кроветворения в фетальной печени играют стромальные клетки мезенхимы. Вместе с тем, существует ряд работ [11,21], свидетельствующих об участии гепатических клеток-предшественников в регуляции гемопоэза путем секреции цитокинов или непосредственно с помощью межклеточных контактов. В частности, в работе [6] установлено, что гепатические клетки секретируют эритропоэтин (ЕРО) и тромбопоэтин (ТРО), способствующие развитию эритроидных и миелоидных колоний *in vitro* [18]. Способность гепатических клеток поддерживать гемопоэз постепенно теряется в ходе развития печени и полностью пропадает к моменту миграции кроветворения в костный мозг. Это связывают с секрецией гемопоэтическими клетками онкостатина М, индуцирующего пролиферацию и развитие гепатических клеток [9]. Таким образом, взаимосвязь гепатических и гемопоэтических клеток, очевидно, способствует развитию обоих типов клеток в раннем эмбриогенезе. Кроме того, в некоторых работах была показана совместная экспрессия этими двумя типами клеток различных антигенов. Так, маркер CDw75 экспрессируется на поверхности как эритроидных, так и гепатических клеток предшественников [17]. Интересные данные были получены при определении иммунофенотипа овальных клеток взрослой печени человека. Было показано, что при активации данные клетки были позитивны на такие классически гемопоэтические маркеры, как CD34, c-kit (CD117) и Thy-1 (CD90) [7,14].

Существуют также данные о наличии в фетальной печени клеток мезенхимально-эпителиального перехода, способных к поддержанию кроветворения *in vivo* и *in vitro*, однако в данном исследовании эти клетки обнаружены не были. Клетки мезенхимально-эпителиального перехода характеризуются наличием поверхностных маркеров, характерных как для эпителиального ростка (цитокератины СК-8, СК-18, СК-19, а также E-cadherin, AFP, albumin), так и для мезенхимального (vimentin, ASMA, CD29, CD44, Stro-1 и др.). Как и в случае с клетками гепатического ряда, данные клетки теряют свою способность к поддержанию гемопоэза после

миграции кроветворения из печени в костный мозг [4,22].

Вывод. Фенотипический анализ клеток печени человека 8-10 недель гестации свидетельствует, что в фрагменте печени преобладают эритроидные клетки представленные в основном эритроидными предшественниками (эритробластами) различной степени зрелости ($49,8 \pm 6,4\%$).

Таким образом, проведенное в работе исследование позволило выявить основные типы клеток печени человека 8-10 недель гестации.

Перспективы дальнейших исследований. Результаты настоящей работы могут служить экспериментальным обоснованием изучения возможности клинического применения клеток фетальной печени в терапии анемий, связанных с нарушением кроветворения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Грищенко В.И. Гемопоэтические клетки эмбриональной печени. - К. / Г.С. Лобынцева, Вотякова И.А, Шерешков И.А // Наукова думка. - 1988. - 192 с.
2. Платонов А.Е. Статистический анализ в биологии и медицине: задачи, терминология, компьютерные методы. - М./ ПАМН, 2000. - 52 с.
3. Broudy V. Tumor necrosis factor a stimulates human endothelial cell to produce granulocyte macrophage colony-stimulating factor/ K. Kaushansky, G.Segal. [et al.] // -1986. - Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. - Vol. 83. - P.7467-7471.
4. Chagraoui J. Fetal liver stroma consists of cells in epithelial-to-mesenchymal transition / A. Lepage-Noll, A. Anjo, G. Uzan, P. Charbord // Blood.- 2003.-Vol.101.- P.2973-2982.
5. Emura I. Ultrastructural identification of the hemopoietic inductive microenvironment in the human embryonic liver / M. Sekiya, Y. Ohnishi // Arch. Histol. Japon. - 1984. - Vol. 47, № 1. - P. 95-112.
6. Kinoshita T. Oncostatin M suppresses generation of lymphoid progenitors in fetal liver by inhibiting the hepatic microenvironment / K. Nagata, N. Sorimachi [et al.] // Experimental Hematology -2001-№ 29. - P. 1091-1097.
7. Lemmer E.R. Isolation from human fetal liver of cells co-expressing CD34 haematopoietic stem cell and CAM 5.2 pancytokeratin markers / E.G. Shepard, K. Blakolmer, R.E. Kirsch, S.C. Robson // J. Hepatol. - 1998.- Vol. 29. - P. 450-454.
8. Maximow A. Der Lymphozyt Als Gemeinsame Stammzelle Der Verschiedenen Blutelemente In Der Embryonalen Entwicklung Und Im Postfetalen Leben Der Sugetiere// Folia Haematologica. - 1909. - Vol. 8. - P. 125-34.
9. Miyajima A. Role of Oncostatin M in hematopoiesis and liver development/ T. Kinoshita, M. Tanaka [et al.] // Cytokine & Growth Factor Reviews. -2000.- № 11. - P. 177-183.
10. Nakahata T. Cell surface antigen expression in human erythroid progenitors: erythroid and megakaryocytic markers // Okumura N. // Leuk. Lymphoma. - 1994. - Vol. 13, 5-6. - P. 401-419.
11. Naughton B.A. Granulopoiesis and colony stimulating factor production in regenerating liver / C. Gamba-Vitalo, G.K. Naughton, P. Liu, A.S. Gordon // Exp Hematol -1982.- Vol.10. - P.451.
12. O'Donoghue K. Fetal stem cells / N. Fisk // Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology. - 2004. - Vol. 18, № 6. - P. 853-875.
13. Ohneda O. Murine endothelial cells support fetal liver erythropoiesis and myelopoiesis via distinct interactions / V.

- Bautch // British Journal of Haematology. -1997.- Vol. 98. -P. 798-808.
14. Petersen B.E. Hepatic oval cells express the hematopoietic stem cell marker Thy-1 in the rat / J.P. Goff, J.S. Greenberger, G.K. Michalopoulos // Hepatology. -1998- №27. - P. 433-445.
 15. Petrenko A.Yu. Isolation of intact mitochondria and hepatocytes using vibration / A.N. Sukach // Analytical Biochemistry. - 1991. - Vol. 194. -P. 325-329.
 16. Tarasov A.I. The osmotic characteristics of human fetal liver-derived hematopoietic stem cell candidates // A.Yu. Petrenko, R. Jones // Cryobiology. - 2004. - Vol 48, № 3. - P. 333-340.
 17. Timens W. Hemopoiesis in Human Fetal and Embryonic Liver/ W.A Kamps // Microscopy Research and Technique -1997.- Vol.39. - P. 387-397.
 18. Shimada Y. Production of thrombopoietin (TPO) by rat hepatocytes and hepatoma cell lines / T. Kato, K. Ogami [et al.] // Exp Hematol.-1995.- № 23. - P.1388.
 19. Sieff C. Interleukin 1 induces cultured human endothelial cell production of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor / S. Tsai, D. Faller // Journal of clinical investigations. -1987.- Vol. 79.-P. 48-51.
 20. Szilvassy S.J. The Biology of Hematopoietic Stem Cells // Arch. Med. Res. - 2003. - Vol. 34, № 3. - P. 446-460.
 21. Wang S.Y. Constitutive production of colony-stimulating factors by human hepatoma cell lines: possible correlation with cell differentiation / L.Y. Chen, T.F. Tsai [et al.] // Exp Hematol -1996.- Vol. 24.-P.437.
 22. Zhang H. The existence of epithelial-to-mesenchymal cells with the ability to support hematopoiesis in human fetal liver/ Z. Miao, Z. He // Cell Biology International -2005.- № 29. - P. 213-219.

УДК 612.35.014.2-053.1

МОРФОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ КЛІТИННОГО СКЛАДУ ФЕТАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ ЛЮДИНИ

Петренко Ю.О., Грицай Д.В., Говоруха Т.П., Репін Н.В., Петренко О.Ю.

Резюме. Методами світлової та електронної мікроскопії був досліджений клітинний склад фетальної печінки людини 8-10 тижня гестації. Показано, що клітинний склад фетальної печінки людини гетерогенний й включає базофільні, ортохроматичні і поліхроматичні еритробласти, проеритробласти, ретикулоцити, ендотеліоцити та інші. Клітини гепатичного ряду складають всього біля 20%. Лімфоїдні клітини у фетальній печінці людини 1-го триместру розвитку виявляються достатньо рідко й представлені недиференційованими попередниками та претендентами на стовбурові клітини. Виходячи з того, що у фетальній печінці переважають еритроїдні попередники різного ступеня зрілості, отримані результати можуть служити експериментальним обґрунтуванням клінічного застосування клітин фетальної печінки у терапії анемії різної етіології.

Ключові слова: фетальна печінка людини, морфологія, гемопоез, електронна мікроскопія, клітинний склад.

UDC 612.35.014.2-053.1

MORPHOLOGIC INVESTIGATION of CELLULAR COMPOSITION of a HUMAN FETAL LIVER

Petrenko Yu.A., Gritsai D.V., Govorukha T.P., Repin N.V., Petrenko A.Yu.

Summary. A cellular composition of a human fetal liver, gestation 8-10 weeks, was investigated by means of light and electronic microscopy. It was shown that a cellular composition of a human fetal liver is heterogenous and includes basophilic, orthochromatic and polychromathophilic erythroblasts, proerythroblasts, reticulocytes, endotheliocytes, etc. Cells of the hepatic row compose only 20%. Lymphoid cells in a human fetal liver of the 1-st trimester of development are revealed sufficiently rarely and are presented by non-differentiated precursors and pretenders to stem cells. Recognizing that in a fetal liver erythroid precursors of different degree of maturity predominate, the obtained results may serve as an experimental justification of possibility of application of liver fetal cells in clinical practice in the therapy of anemia of different etiology.

Key words: human fetal liver, morphology, hemopoiesis, electronic microscopy, cellular composition.

Стаття надійшла 11.05.2010 р.