

Н.А. Юзефович, Т.М. Студеникина

**МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СТРУКТУР
СТЕНКИ БРОНХОВ В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ БЕЛОЙ КРЫСЫ**
УО «Белорусский государственный медицинский университет»

Проведен морфометрический анализ структур стенки бронхов в эмбриогенезе белой крысы, изучено формирование эпителиальных и мезенхимальных клеточных слоев. Установлены основные этапы развития, дифференцировки тканей и формирование различных клеточных типов.

Морфометрические методы доступны, объективны, показательны, что позволяет широко использовать их в эмбриологических исследованиях.

Ключевые слова: *морфометрический анализ, эмбриогенез, эпителий, мезенхима, дифференцировка, формирование клеточных типов.*

Оригинальные научные публикации

N.A. Yuzefovich, T.M. Studenikina

MORPHOMETRIC ANALYSIS OF THE BRONCHIAL STRUCTURE IN RAT EMBRYOGENESIS

The morphometric analysis of bronchial tubes in rat embryogenesis was carried out, and the formation of epithelial and mesenchymal cells was studied. The main stages of the development, tissue differentiation and different cells types formation were determined. The morphometric method is available, as well as, objective and indicative; that allows to use it for embryological research.

Key words: *morphometric analysis, embryogenesis, epithelium, mesenchyme, differentiation, cells types formation.*

Вопросы формирования органов и тканей в ходе эмбрионального развития человека и животных являются актуальными, поскольку их решение имеет не только теоретическое значение, но и помогает понять механизмы аномалий [3].

Развитие системы органов дыхания отличается от развития других систем прежде всего отсутствием в эмбриогенезе дефинитивной функции (дыхания), а значит, процессы формирования более растянуты во времени. С одной стороны, это приводит к большей вероятности повреждения и частым ВПР, а с другой - делает эту систему более удобным объектом для детального изучения процесса развития.

Цель исследования: проведение морфометрического анализа структур стенки бронхов с 11 по 21 сутки эмбриогенеза белой крысы для установления этапов развития, дифференцировки тканей и формирования разных клеточных типов.

Материалы и методы

В работе использованы срезы легкого 14 плодов белых крыс из коллекции кафедры гистологии с 11 по 21 сутки эмбриогенеза (Таблица 1). Плоды фиксированы в 10% формалине, заливали в парафин после проводки через хлороформ обычным способом. Готовились срезы толщиной 7-10 мкм. Срезы окрашивались гематоксилин-эозином.

При изучении морфогенеза легких использованы методы морфометрии [4,10]. В каждом случае измерялись площадь, периметр, максимальный и минимальный диаметр ядер эпителиальных и мезенхимальных клеток, вычислялись логарифм их площади, а также их фактор

формы и элонгация, внутри каждого срока развития для каждой из указанных количественных характеристик рассчитывалась описательная статистика: среднее, стандартное отклонение, стандартная ошибка, и пр. (дисперсия, коэффициент вариации, асимметрия, эксцесс) [7].

Основные этапы развития легкого

Мы изучали развитие бронхиального дерева белой крысы. В целом, в эмбриогенезе легких белой крысы (весь период эмбрионального развития белой крысы составляет 21 сутки), как и других млекопитающих и человека, выделяют 4 стадии:

- **Эмбриональная** (9-12 сутки). На 9 сутки эмбриогенеза образуется вентральный дивертикул передней кишки, который вместе с окружающей мезенхимой представляет собой закладку легкого. Эпителиальные почки, погруженные в окружающую их мезенхиму, отграничены от лежащих рядом структур уплотненной «капсулой» (будущей плеврой). Доля мезенхимы в закладке легкого во много раз преобладает над эпителиальными структурами.

- **Псевдогландулярная** (13-16 сутки). В эту стадию образуются воздухоносные пути (т.е. формируется нереспираторная часть легкого до терминальных бронхиол). Эпителиальные трубочки продолжают дихотомически делиться и вырастают в окружающую мезенхиму. Бронхи на этой стадии представляют собой узкие трубки с толстыми эпителиальными стенками, выстланные цилиндрическим или кубическим эпителием и окруженные мезенхимой (рис.1). Эта картина напоминает экзокринную железу (откуда название стадии). К окончанию стадии обнаруживаются различия в строении бронхов разного калибра: крупные бронхи (долевые и сегментарные) выстланы многорядным

Таблица 1. **Материалы исследования**

Возраст плодов, сутки	Кол-во плодов	Кол-во изученных бронхов	Объем выборки	
			Кол-во ядер эпителия	Кол-во ядер мезенхимальных клеток
11	2	6	91	81
13	2	8	104	67
15	2	2	33	17
18	2	13	129	104
19	2	12	176	106
20	2	12	324	98
21	2	6	227	147
ВСЕГО	14	59	1048	620

Таблица 2. Гистограммы распределения ядер клеток бронхов по фактору формы. По оси абсцисс – значения фактора формы, по оси ординат – количество ядер.

Возраст, сут	Ядра эпителиоцитов	Ядра мезенхимальных клеток
13		
15		
19		
21		

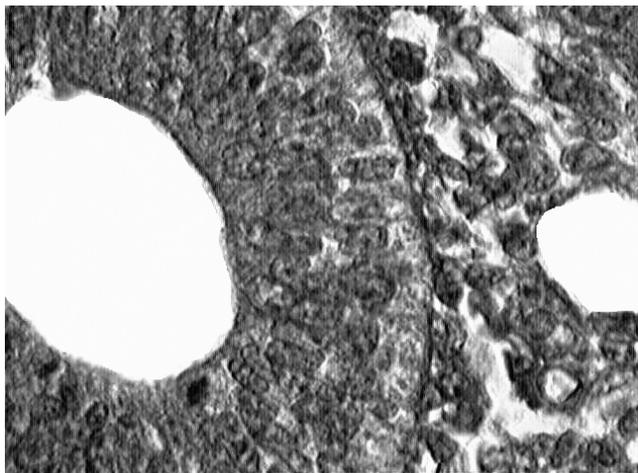


Рис. 1. Легкое эмбриона белой крысы на 15 сутки развития (мелкий бронх) (окраска гематоксилин-эозином, увеличение x 400).

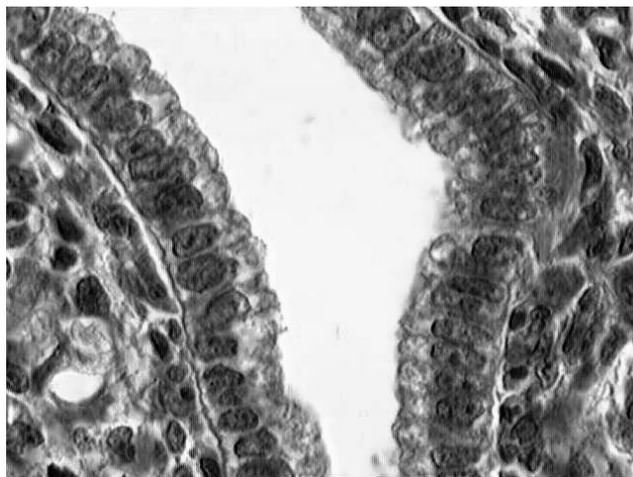


Рис. 2. Бронх эмбриона белой крысы на 18 сутки развития (окраска гематоксилин-эозином, увеличение x 400).

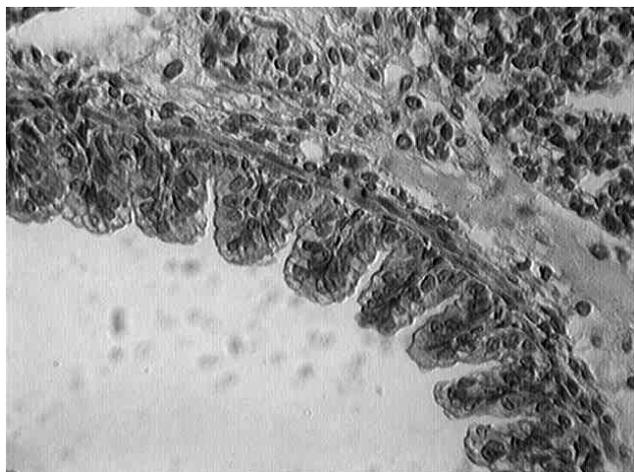


Рис. 3. Формирование оболочек стенки бронха эмбриона белой крысы на 21 сутки развития (окраска гематоксилин-эозином, увеличение x 400).

цилиндрическим эпителием, собирающимся в небольшие складки. Будущее фиброзно-хрящевая оболочка их представлена сгущением мезенхимы. Средние бронхи отличаются от крупных наличием значительной складчатости внутреннего просвета, который приобретает вид щели, и формированием снаружи от слизистой оболочки плотного слоя гладкой мышечной ткани. Мелкие бронхи имеют просвет правильной округлой формы, без складок; эпителий их также многорядный. Мышечная оболочка не определяется. Мезенхимная часть закладки легкого по-прежнему значительно преобладает над эпителием (рис.1).

- В **каналикулярную** стадию (17-18 сутки) происходит формирование примитивных респираторных бронхиол путем ветвление дистальных отделов воздухоносных путей. Сами же воздухоносные пути - бронхи развиваются далее: расширяется их просвет, истончается выстилающий эпителий, формируются разные типы клеток, дифференцируется окружающая мезенхима (рис.2). Так, в крупных бронхах дифференцируется фиброзно-хрящевая оболочка, на срезах появляются пластины эмбрионального хряща.

- **Саккулярная** (19-21 сутки). Саккулярная стадия

характеризуется появлением, удлинением и окончательным ветвлением респираторных путей - нефункционирующих альвеолярных мешочков. В периферических частях легкого они приобретают округлую форму и напоминают дефинитивные альвеолы; в центральных, прикорневых частях, сохраняются неправильные вытянутые очертания их. Однако стенки альвеол выстланы низким кубическим и плоским эпителием, что отражает неполную пренатальную дифференцировку альвеолярного эпителия. Альвеолы в легких не однородны. Часть их достигает больших размеров и имеет истонченные стенки с уплощенным эпителием (более дифференцирована) другая часть (их большинство) мельче, вокруг них более толстые межальвеолярные перегородки. Происходит окончательная дифференцировка стенки бронхов: формируются складки слизистой оболочки, эпителий становится многорядным, в нем обнаруживаются клетки разных типов, различаются соединительнотканная и гладкомышечная пластинки (рис.3).

В развитии отдельных органов и организма в целом возникают количественные изменения: рост клеток; и сменяющие их качественные изменения: детерминация (окончательная экспрессия одной и репрессия другой части генома), пролиферация (перемещение генетического материала) и дифференцировка (образование специфических структур) клеток [2,6]. Эти процессы отличаются такой точностью, что даже незначительное отклонение приводит в последующем к грубым поломкам всей системы [8]. Во время роста система находится в более стабильном состоянии, менее подвержена внешним влияниям. Для понимания процессов нормального и аномального формирования органов важно знать сроки эмбрионального развития, когда периоды количественных и качественных изменений сменяют друг друга.

В настоящее время существует множество методов выявления стадий развития и этапов дифференцировки. Так, с помощью электронной микроскопии можно выявить формирования специфических органелл, например, ресничек на поверхности реснитчатых клеток или капель слизи в бокаловидных клетках. С помощью иммуногисто-

химических методов могут быть обнаружены специфические клеточные рецепторы, являющиеся маркерами дифференцировки.

Мы выбрали наиболее доступный метод - метод морфометрии, который оказался достаточно точным для регистрации этапов дифференцировки [1,5]. Мы проанализировали развитие эпителиальной выстилки и соединительной ткани слизистой оболочки бронхов. Взаимодействие эпителиальных слоев с прилежащими мезенхимальными клетками является хорошо изученным примером вторичной индукции. Только при непосредственном контакте этих двух эмбриональных структур происходит их усиленное развитие; при изоляции их в эксперименте нарушается дальнейшая дифференцировка и эпителиальных, и мезенхимальных структур [9]. Поэтому морфометрическое изучение обоих зачатков дает полную информацию о периодах дифференцировки.

Изменения размеров ядер в процессе гистогенеза носят закономерный характер и могут служить одним из косвенных критериев дифференциации клеточного материала. Фактор формы и элонгация, описывающие форму ядер, позволяют количественно оценить уплотнение респираторного эпителия и ориентировку клеток в клеточных пластах.

Поскольку мы заранее знаем, что в изучаемых клеточных популяциях формируются клетки разных типов с разными значениями количественных характеристик (т.е. крупные и мелкие, округлые и уплощенные), то мы решили анализировать не средние значения указанных характеристик, а графически представить выборку целиком с помощью гистограмм.

Мы изучили гистограммы распределения ядер эпителиальных и мезенхимальных клеток по всем указанным характеристикам, но наиболее интересной нам показалась динамика изменения формы ядер эпителиальных и мезенхимальных клеток. Изменения фактора формы ядер позволили нам сделать выводы о периодах дифференцировки в процессе развития.

Фактор формы - это показатель отклонения формы проекции ядра от формы круга и рассчитывается из соотношения площади ядра и квадрата периметра ($4\pi S/P^2$). Фактор формы изменяется в границах от 0 до 1. Чем более вытянуто ядро, тем меньше значения фактора формы, и наоборот, чем больше проекция ядра напоминает окружность, тем ближе к 1 значение фактора формы.

Для наглядного представления всей выборки на гистограмме по оси абсцисс откладываются интервалы значений фактора формы, а по оси ординат - частоту встречаемости значений из этих интервалов. При анализе фактора формы ядер эпителиальных клеток выясняется (Табл.2), что до 15 сут. эмбриогенеза форма ядер эпителиальных клеток примерно однотипная, наблюдается тенденция к удлинению ядер. С 15 сут. выявляются разные по форме ядра (несколько вершин на гистограмме), что, очевидно, является показателем формирования разных типов эпителиоцитов. Лишь к концу эмбрионального развития гистограмма вновь становится одновершинной, что, видимо, говорит о преобладающем формировании единого эпителиального типа.

В клетках окружающей мезенхимы наблюдаются сле-

дующие изменения: до 15 сут. также имеет место одновершинная гистограмма, т.е. клетки мезенхимы достаточно однородны. С 15 сут. появляется группа клеток с более вытянутыми ядрами. Эти две группы клеток сохраняются до конца эмбрионального развития, что очевидно, свидетельствует о формировании двух популяций: фибробластической и гладкомышечной.

Результаты и обсуждение

Таким образом, в формировании слизистой оболочки бронхов можно выявить два этапа: до 15 суток, когда и эпителий, и подлежащая мезенхима незрелы и там, очевидно, происходят процессы детерминации. С 15 суток начинается дифференцировка тканей и формирование разных клеточных типов.

Выводы

1. Изучение эмбриогенеза слизистой оболочки бронхов с помощью морфометрических методов исследования позволило выявить закономерности в становлении клеточных популяций.

2. Использование только одного параметра - фактора формы ядер эпителиоцитов и мезенхимальных клеток слизистой оболочки бронхов - объективно показало наличие двух основных этапов формирования тканевых компонентов: до 15 суток, когда, очевидно, преобладают процессы детерминации и после 15 суток. В этот период начинается дифференцировка тканей и формирование разных клеточных типов.

3. Морфометрические методы доступны, объективны, показательны, что позволяет широко использовать их в эмбриологических исследованиях.

Литература

1. Автандилов, Г.Г. Медицинская морфометрия. - М.: Медицина, 1990. - 384 с.
2. Белоусов, Л.В. Биологический морфогенез. - М.: Изд. МГУ, 1987. - 238 с.
3. Брусиловский, А.И. Проблемы гисто- и эмбриогенеза и задачи медицинской эмбриологии / А.И. Брусиловский // Актуальные проблемы развития человека и млекопитающих. - Симферополь, 1983. - Том 101, С. 88-89.
4. Вейбель, Э.Р. Морфометрия легких человека. Изд. «Медицина». - М., 1970. - С. 175.
5. Гуцол, А.А. Практическая морфометрия органов и тканей. Монография / А.А. Гуцол, Б.В. Кондратьев; Томск: Изд-во Томского ун-та, 1988. - 134 с.
6. Зашихин, А.Л. Дифференцировка клеток стенки бронхов в ранний период эмбрионального развития легких / А.Л. Зашихин // Архив анат., гистол. и эмбриол. - 1991. - 101, № 7. - С. 67-73.
7. Слука, Б.А. Кариометрическая характеристика тканей легкого крысы при пренатальном развитии. // Морфология. - 1993. - т. 104. - № 1-2. - с. 85-93.
8. Le-Souef, P.N. Growth and development of the lung. / P.N. Le-Souef // Curr. Opin. Allergy. Clin. Immunol. 2001: 1 (2). - С. 127-131.
9. Masters, J.R.W. Epithelial-mesenchymal interaction dulling lung development: The effect of mesenchymal mass. / J.R.W. Masters // Develop. Biol., 1976. - v. 51. - № 1. - P. С. 267-277.
10. Moschopoulos, M. Morphometric analysis of fetal rat lung development / M. Moschopoulos, P.H. Buir // Anat. Rec. - 1993. - 237 (1). - С. 38-48.

Поступила 18.11.2013 г.