

ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ НАН РА ИМ. АКАД. Л.А. ОРБЕЛИ

ТАТОЯН МАРИНА РАЗМИКОВНА

**ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭРИТРОПОЭЗА
В ОНТОГЕНЕЗЕ СВИНЕЙ**

Диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук
по специальности
03.00.09 – Физиология человека и животных

Научный консультант:

засл. деятель науки,
д.м.н, профессор кафедры
гистологии ЕрГМУ Азнаурян А.В.

ЕРЕВАН 2017

О Г Л А В Л Е Н И Е

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ	3
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1. Эмбриональный гемопоэз.....	16
1.2. Постэмбриональный гемопоэз и его регуляция	29
1.3. Номенклатура клеток костного мозга и крови	39
1.4. Эритропоэз	45
1.5. Использование свиней для экспериментального моделирования.	62
1.6. Периодизация онтогенеза млекопитающих.....	71
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ	81
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ	94
ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ЭМБРИОНАЛЬНОГО ЭРИТРОПОЭЗА СВИНЕЙ	94
3.1. Периодизация внутриутробного развития свиней.	94
3.2. Эмбриональное развитие сердечно-сосудистой системы	102
3.3. Мезенхимальный эритропоэз в эмбриогенезе свиньи.	104
3.4. Эмбриональный гемопоэз в желточном мешке. Кровяные островки	112
3.5. Эмбриональный эритропоэз в печени свиньи	120
3.6. Эмбриональный эритропоэз в селезенке.....	127
3.7. Кроветворение в костном мозге.....	130
3.8. Онтогенез эритробластических островков свиньи.....	136
3.9. Онтогенез эритроидных клеток свиньи.....	145
3.10. Сравнительная характеристика раннего эритропоэза млекопитающих	159
ГЛАВА 4. МОРФОЛОГИЯ И РАЗВИТИЕ КЛЕТОК НОРМОБЛАСТИЧЕСКОГО ЭРИТРОПОЭЗА В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ СВИНЬИ	166
ГЛАВА 5. РЕГУЛЯЦИЯ ЭМБРИОНАЛЬНОГО ЭРИТРОПОЭЗА СВИНЕЙ МАТЕРИНСКИМИ КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩИМИ ФАКТОРАМИ	171
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	178
ВЫВОДЫ	186
ЛИТЕРАТУРА	188

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ГСК	- гемопозитические стволовые клетки
МСК	- мезенхимальными стволовыми клетками
КСФ	- колониестимулирующий фактор
Г-КСФ	- гранулоцитарный колониестимулирующий фактор
М –КСФ	- макрофагальный колониестимулирующий фактор
ГМ – КСФ	- грануломоноцитарный колониестимулирующий фактор
КОЕ – ГЭ	- колониеобразующая единица гранулоцито- и эритроцитопоеза
КОЕ –МГЦЭ	- колониеобразующая единица мегакариоцито- и эритроцитопоеза
КОЕ –Г	- колониеобразующая единица гранулоцитов
КОЕ –М	- колониеобразующая единица моноцитопоеза
КОЕ –Эо	- колониеобразующая единица эозинофилов
КОЕ – Б	- колониеобразующая единица базофилов
КОЕ – МГЦ	- колониеобразующая единица мегакариоцитов
КОЕ-ГЭММ	- колониеобразующая единица гранулоцитов, эритроцитов, моноцитов и мегакариоцитов
БОЕ-Э	- бурстобразующая единица эритротроидных клеток
КОЕ-Э	- колониеобразующая единица эритроидных клеток
КОЕ-ГМ	- колониеобразующая единица гранулоцитов и макрофагов
ЭКП	- эритроидные клетки-предшественники
АГМ (AGM)	- аорто-гонодо-мезонефральная область
ЕРО	- эритропоэтин
SCF	- фактор стволовых клеток
IL	- интерлейкин
СКК	- стволовые кроветворные клетки
ТФР-β	- трансформирующий фактор роста-β
ФНО	- фактор некроза опухолей
LIF	- лейкемия ингибирующий фактор

ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
РНК	- рибонуклеиновая кислота
ЭО	- эритробластические островки
ИФА	- иммуноферментативных анализ
ELISA	- enzyme-linked immunosorbent assay
Нб	- гемоглобин
Пг	- пиктограмм
КМ	- костный мозг
ЭО	- эритробластические островки

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Объем познаний в области гематологии огромен и постоянно возрастает, являясь наукой о крови, клетках крови и кроветворных органах. Зародившись, как раздел описательной гистологии в период бурного развития морфологических наук в середине XIX столетия, гематология стала опорой в самостоятельном становлении и развитии цитологии, эмбриологии, иммунологии, генетики, онкологии и трансфузиологии. Пребывание в состоянии постоянной физиологической регенерации делает клетки крови и кроветворных органов исключительно удобной моделью для исследования закономерностей клеточной пролиферации, а многообразие морфологических форм и функций позволяет изучать тонкие механизмы дифференциации и созревания клеток. Вскрытие закономерностей пролиферации и дифференцировки гемопоэтических клеток, играющих жизненно важную роль в организме, продолжает оставаться фундаментальной проблемой гематологии.

Кровь – сложная функциональная система, обеспечивающая своевременную доставку кислорода и питательных веществ клеткам тканей и удаление продуктов метаболизма из органов и интерстициальных пространств.

Как система, кровь не только саморегулирующаяся структура, но и сложный комплекс компонентов, включающихся в систему и выпадающих из нее по мере «запроса», исходящего из тканей и органов. Уровень функциональной активности системы крови может резко повышаться при отклонениях физиологических функций от оптимального для метаболизма уровня.

В рамках системного подхода, согласно классификации биологических объектов, кровь относится к корпускулярно-нуклеарным системам, отличающимся высокой надежностью функционирования (за счет регенерации однотипных клеток) и реакцией, как единого целого, на возмущающие воздействия. Согласованность действий ее частей «оплачивается» тем, что при поражении центрального элемента (костного мозга) неизменно нарушается вся система. Равновесные динамические системы клеточных популяций предполагают метаболическое взаимодействие их с другими тканями и стоящих над ними регулирующих механизмов [Липунова Е.А, Скоркина М.Ю., 2004].

Функциональная система крови обеспечивает гомеостатический потенциал

организма и его способность противостоять экстремальным воздействиям благодаря совершенным механизмам регуляции физиологических функций – генетического консерватизма рецепторов и пластичности исполнительного аппарата.

Кровь объединяет работу многих физиологических систем организма, «накапливает» конечные приспособительные «результаты» их деятельности.

Своеобразие системы крови состоит и в том, что патологические изменения в ней возникают вследствие нарушения функций не только отдельных ее компонентов, но и других органов и систем организма в целом. Любое заболевание, патологический процесс, а также ряд физиологических сдвигов могут в той или иной степени отразиться на количественных и качественных особенностях состава циркулирующей крови. Этим и определяется огромное значение необходимости изучения крови (как «кровяного зеркала организма») и вскрытия закономерностей ее изменений при различных заболеваниях [Леонова Е.В. и соав., 2005].

Кровь во взрослом организме – одна из важнейших интегрирующих систем. В процессе эмбриогенеза она является носителем факторов, регулирующих процессы роста и дифференцировки органов и тканей. В организме человека ежедневно продуцируется и одновременно погибает 500 млрд клеток крови. Это ставит систему гемопозеза на первое место среди всех тканей и органов по темпам клеточного самообновления [Nogueira-Pedro A. et al., 2016]. В таких условиях для поддержания клеточного баланса требуется, прежде всего, определенное количество стволовых клеток с закрепленной генетической программой их развития в кроветворном направлении, а также наличие эпигенетических механизмов, регулирующих реализацию пролиферативного и дифференцировочного потенциала гемопозитических стволовых клеток (ГСК) [Семенова Н.Ю. и соавт., 2014].

Процесс кроветворения исключительно интенсивен и в ходе его производится поистине астрономическое число клеток - более 2,5 млн. в минуту для поддержания уровня устойчивого состояния 25 триллиона циркулирующих эритроцитов. В течение жизни человека годовая продукция кроветворной системы составляет такое число клеток, что суммарный их вес, примерно, равен весу человека, а за всю жизнь образуется около 5 тонн клеток крови. Уже сама по себе такая производительность составляет огромную проблему для понимания механизмов поддержания кроветворения [McGrath K.E. et al., 2017]. Но этим

дело не ограничивается. В организме продуцируются клетки крови по меньшей мере восьми направлений дифференцировки. При стабильном кроветворении соотношение между ними, пропорция клеток каждой линии, поддерживается более или менее на одном и том же уровне. Однако при возмущающих воздействиях продукция тех или иных клеток резко меняется - после кровопотери увеличивается выработка эритроцитов, при воспалении – гранулоцитов и т.д.

Одной из центральных проблем современной молекулярной и клеточной биологии является изучение механизмов регуляции развития и функционирования клеточных систем эукариот. Все модели для исследования этих процессов создаются и используются с целью познания закономерностей нормального и патологического роста и развития клеток и тканей животных и человека. Важнейшим звеном в ее решении является изучение внутриклеточных, популяционных и системных механизмов регуляции двух фундаментальных процессов – пролиферации и дифференцировки, соотношение которых изменяется в ходе развития и функционирования клеточных популяций и определяется деятельностью генетического аппарата клеток и регуляцией его активности. Поэтому, особо важное место в этих исследованиях занимает изучение количественных и структурных изменений ДНК в ядрах клеток, значение этих изменений в осуществлении процессов цитодифференцировки, их взаимосвязи с терминальной специализацией и, в конечном итоге, реализации программы развития клеточных популяций в целом. Наиболее доступными и удобными моделями для такого рода исследований являются популяции кроветворных клеток и, в частности, эритроцитарная клеточная популяция, на примере которой хорошо демонстрируется связь дифференцировки и пролиферации [Каралова Е.М., 2012].

Кроветворная система, прежде всего костный мозг, обеспечивает образование огромного количества клеток нужного вида, в нужное время и в нужном месте. В основе поддержания постоянства количественного и качественного состава каждого клеточного звена системы крови в условиях постоянно меняющихся потребностей организма в клетках крови лежит соблюдение основного закона кинетики кроветворения: «В единицу времени рождается и умирает одно и то же количество клеток». Соблюдение этого закона обеспечивается сложными механизмами регуляции кроветворения. Болезни крови можно рассматривать как нарушение закона клеточного равновесия [Владимирская Е.Б., 2015].

Кроветворная ткань представляет собой уникальную и наиболее экспериментально продвинутую модель для изучения механизмов дифференцировки и регенерации. Для нее характерно многообразие клеточных форм, различающихся по степени зрелости и специфике обменных процессов, а также линий (ростков) дифференцировки (эритроидная, гранулоцитарная, моноцитарная, мегакариоцитарная, лимфоидная). В какой-то мере созревание в каждом ростке кроветворения повторяет филогенез кроветворения: если безъядерные эритроциты появились лишь у млекопитающих, а у птиц, рыб они еще содержат ядра, то созревание клеток красного ряда у человека проходит через стадии ядродержащих эритрокариоцитов в костном мозге, а в кровь поступают безъядерные зрелые эритроциты. Первичные фагоцитирующие элементы не имели дифференцированных ядер и специфической зернистости; гранулоциты в своей дифференцировке проходят эту стадию в костном мозге.

Таким образом, своеобразный эмбриогенез крови совершается непрерывно на протяжении всей жизни человека. Несмотря на это, подавляющее большинство клеток крови являются зрелыми и не способными к дальнейшей пролиферации с коротким жизненным циклом. Поэтому в течение всей жизни происходит новообразование клеток крови.

Зрелость клеточных элементов, циркулирующих в крови, может быть различной, так как в зависимости от потребности из кроветворных органов могут выходить и вполне зрелые, и только еще созревающие клетки, но уже выполняющие свою основную задачу: фагоцитирующие инородные частицы, транспортирующие кислород, образующие первичный тромб. Более того, в крови могут находиться и совсем незрелые клеточные элементы, даже стволовые кроветворные клетки и их ранние потомки, способные самостоятельно поддерживать кроветворение после трансплантации реципиенту с уничтоженной кроветворной системой [Воробьев Д.И., 2002].

Клеточную основу, обеспечивающую восстановление зрелых клеток крови и кроветворной ткани в целом после естественной гибели терминально дифференцированных клеток, в ходе патологических процессов или действия различных повреждающих агентов, составляют гемопоэтические стволовые клетки. Благодаря самоподдержанию ГСК, возникнув в эмбриогенезе, не исчезают из кроветворной ткани и служат источником пополнения зрелых клеток на протяжении жизни организма. Полипотентность, т.е. способность давать

потомство клеток, дифференцирующихся по многим направлениям, обеспечивает многообразие форменных элементов крови. Другое отличительное свойство кроветворной ткани - способность менять место локализации. Перемещение кроветворной ткани происходит в эмбриональном развитии, когда циркулирующие клетки репопулируют (заселяют) закладки кроветворных органов, а также в экспериментальных условиях и патологии при формировании эктопических очагов гемопоэза [Домарацкая Е.И., 2004].

Концепция возобновления тканей за счет самоподдерживаемого пула стволовых клеток была впервые сформулирована более 100 лет назад при изучении кроветворения. Однако существование гемопоэтических стволовых клеток, дающих начало всем клеткам крови, получило экспериментальное подтверждение только в середине XX века. До этого времени считалось, что восполнение клеточного состава тканей постнатального организма обусловлено делением специализированных (дифференцированных) клеток. Обновление за счет активности стволовых клеток рассматривалось как механизм, присущий исключительно клеткам крови – уникальной, быстро обновляющейся ткани, содержащей множество функционально гетерогенных типов клеток [Владимирская Е.Б., 2007].

В настоящий момент доказано, что поддержание и возобновление клеточного состава практически всех тканей организма человека, включая эпителий кожи и кишечника, печень, скелетные мышцы и др., происходят благодаря пролиферации и дифференцировке соответствующих тканеспецифичных стволовых клеток. Однако наряду с ними, в тканях млекопитающих обнаружены и другие стволовые клетки, названные мезенхимальными стволовыми клетками (МСК) [Кокорев О.В. и соавт., 2005].

Первые данные, свидетельствующие о присутствии в костном мозге не только гемопоэтических клеток, но и еще одной популяции постнатальных стволовых клеток, были получены с помощью нескольких подходов. Во-первых, в экспериментальных моделях при интраперитонеальной трансплантации культивированной на носителе стромы костного мозга возникали очаги остеогенеза. Во-вторых, из костного мозга была выделена популяция клеток, отличных от гемопоэтических стволовых клеток, но обладающих свойствами стволовых. Эти клетки образовывали клоны (колонии фибробластов) при культивировании, сохраняя способность к дифференцировке в нескольких направлениях (в остеобласты, адипоциты и хондроциты) [Шевцова Н.М. и соавт., 2009; Волкова И.М. и соавт., 2012].

По аналогии с гемопоэтическими стволовыми клетками предполагалось, что во главе мезенхимальной иерархии стоит мезенхимальная стволовая клетка (МСК) костного мозга (модель «мезенгиума»). В течение жизни потомки этой клетки проходят через дискретные стадии дифференцировки, давая начало различным клеткам соединительных тканей, а именно костной и жировой ткани, сухожилиям, хрящам и гладким мышцам [Шахпазян Н.К. и соавт., 2012]. Позднее клетки, совпадающие с мезенхимальными стволовыми клетками костного мозга по своим фенотипическим характеристикам и дифференцировочному потенциалу, выделены практически из всех эмбриональных и постнатальных тканей млекопитающих, птиц и амфибий. На основании этих наблюдений возникла теория о том, что костный мозг служит депо постнатальных стволовых клеток как гемопоэтических, так и мезенхимальных [Запускалов И.В. и соавт., 2009]. Однако предположение о том, что восстановление соединительных тканей всего организма определяется активностью мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, не получило твердых доказательств до сих пор [Калинина Н.И. и соавт., 2011].

Одно из отличительных свойств мезенхимальных стволовых клеток их низкая иммуногенность. При введении в организм аллогенного реципиента, в отличие от других соматических клеток, не вызывают реакции отторжения. Они без иммуносупрессии приживаются в месте инъекции, сохраняя способность к размножению и дифференцировке [Климович В.Б., 2014].

Мезенхимные стволовые клетки выполняют различные функции в организме, обладают высокой пролиферативной активностью и мультипотентными свойствами, то есть способны дифференцироваться в клетки мезодермальной (остеобласты, хондроциты, адипоциты) и других линий. Мезенхимальные стволовые клетки также способны (прямо и опосредованно) взаимодействовать практически со всеми клетками иммунной системы посредством растворимых факторов и клеточно-контактным взаимодействием и, таким образом, в значительной степени модулировать иммунный ответ организма [Иванюк Д.И. и соавт., 2011].

Приведенные результаты позволяют нам предположить, что в организме существуют два типа мезенхимальных стволовых клеток: циркулирующие в крови МСК костномозгового происхождения, которые принимают участие в репарации тканей при повреждении, и

резидентные МСК, локализованные периваскулярно во всех органах и тканях, которые регулируют физиологическое обновление тканей и поддержание тканевого гомеостаза. Мезенхимальные стволовые клетки считаются важнейшими участниками процессов обновления и регенерации тканей. Во-первых, эти клетки осуществляют регуляцию самоподдержания и дифференцировки тканеспецифичных стволовых клеток. Во-вторых, мезенхимальные стволовые клетки стимулируют рост и осуществляют стабилизацию кровеносных сосудов и нервов в процессах репарации тканей. В-третьих, взаимодействие мезенхимальных стволовых клеток с лимфоцитами, эндотелиальными клетками и аксонами позволяет интегрировать нейрогуморальные сигналы, регулирующие обновление и репарацию тканей [Калинина Н.И. и соавт., 2011].

Мезенхимальные стволовые клетки способствуют росту гемопоэтических предшественников путем секреции ряда цитокинов, макрофагального колониестимулирующего фактора (М-КСФ), гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ), фактора роста стволовых клеток и др.. Мезенхимальные стволовые клетки также могут способствовать миграции гемопоэтических стволовых клеток, введенных путем внутривенной инфузии в костный мозг, экспрессируя хоуминг-рецепторы и хемокины [Кругляков П.В. и соавт., 2006].

Дисбаланс в работе мезенхимальных стволовых клеток и гемопоэтических клеток под действием стрессора сопровождается уменьшением общего количества кариоцитов, в результате чего развиваются лейкопения и (или) анемия и, как следствие, снижение резистентности организма к действию неблагоприятных факторов. С теоретических позиций для борьбы с этим патологическим процессом можно использовать разного рода ростковые факторы, стимулирующие гемопоэз, включая цитокины, интерлейкины, колониестимулирующие факторы (КСФ), которые являются естественными ростковыми факторами для миелопоэза как на уровне кроветворных клеток-предшественников, так и их более дифференцированных потомков – нейтрофилов и моноцитов. Кроме того, колониестимулирующие факторы могут мобилизовать мезенхимальные стволовые клетки из костного мозга в кровь [Латюшин Я.В. и соавт., 2009].

Следует отметить, что результаты большинства экспериментальных исследований гемопоэза на моделях животных были перенесены на гемопоэз человека [Paulson R.F et al.,

2011]]. Тем не менее существуют некоторые различия в гемопоэзе человека и грызунов, особенно анатомическое расположение гемопоэза в течение жизни. У человека селезенка не обеспечивает гемопоэз после рождения, хотя экстрамедуллярный селезеночный гемопоэз может возникать и в период гемопоэтического стресса. В отличие от человека, селезенка грызунов гемопоэтически активна на всем протяжении жизни, более того, во всех костях грызунов происходит гемопоэз, а длинные трубчатые кости (особенно бедренная и большеберцовая) являются главными местами изучения гемопоэза. В противоположность этому гемопоэз в длинных трубчатых костях человека, за исключением их проксимальных отделов, прекращается в возрасте 5–7 лет. В длинных трубчатых костях красный костный мозг замещается на гемопоэтически неактивную жировую ткань [Семенова Н.Ю. и соавтр., 2014].

Подобные экспериментальные модели не дают еще права делать окончательные выводы относительно становления гемопоэза у человеческого эмбриона, они лишь открывают новые возможности для понимания событий раннего эмбриогенеза у человека.

При несостоятельности гемопоэза, для лечения и коррекции различных патологических состояний особенно актуальным является использование в качестве трансплантационного материала эмбриональных стволовых клеток, выделенных из тканей эмбрионов и плодов [Мелкова К.Н., 2012]. К сожалению, в доступной нам литературе не встретились исследования, в которых было бы приведено комплексное изучение динамики морфофункционального состояния эритроцитов, а эмбриональный эритропоэз свиней остается практически неизученным с точки зрения современной биологической науки.

Цель исследования

Изучение особенностей эритропоэза в онтогенезе свиней.

Задачи

1. Исследовать особенности эмбрионального, плодного и постнатального развития кроветворных органов.
2. Выявить закономерности в характере обнаруженных индивидуальных особенностей и на их основе сформулировать критерии для оценки состояния.

3. Изучить механизмы сопряжения популяционных показателей и морфологических сдвигов основных клеток эритропоэза при дифференцировке и созревании в процессе онтогенеза.
4. Изучить физиологические характеристики основных клеток эритропоэза в процессе эмбрионального и постнатального развития.
5. Выявить основные гистохимические показатели клеток эритропоэза и их изменения в процессе онтогенеза

Научная новизна.

Произведено детальное изучение морфологического строения, развития и функционального становления органов кроветворения свиней. Впервые выявлены временные сроки формирования и функционирования основных этапов эритропоэза (гемангиобластического, мегалобластического и нормобластического) в онтогенезе свиней, а также определена динамика эритропоэза свиней в норме позволяющая определить закономерности индивидуального развития.

Изучена популяция мезенхимальных эритроидных клеток на 15-25 сутки эмбрионального развития свиней и определено содержание гемоглобина в разных популяциях эритроидных клеток в онтогенезе свиней.

Показаны структура и клеточный состав кровяных островков в желточном мешке, а также выявлена популяция гипертетраплоидных гемангиобластов, способных к пролиферации в желточном мешке в период внезародышевого эритропоэза свиней. Впервые выявлена экструзия ядер эритробластов на ранних стадиях эритропоэза свиней, также показано, что экструзия ядер не приводит к изменению концентрации гемоглобина в клетке и к изменению его количества.

Выявлено совместное функционирование двух центров эритропоэза (желточный мешок и печень) на 25 сутки внутриутробного развития свиней. Впервые исследованы эмбриональные эритробластические островки печени свиньи и проведено их сравнение с постнатальными эритробластическими островками костного мозга. Исследованы механизмы регуляции эритропоэза эмбриона свиней материнскими сывороточными колониестимулирующими факторами и выявлена возможная роль ГМ-КСФ и М-КСФ в формировании эритробластических островков печени и костного мозга.

Научно–практическое значение

В настоящее время достаточно актуальной является проблема развития кроветворения в эмбриональном периоде млекопитающих. Сведения о формообразовательных процессах, морфологических и гистохимических изменениях роста и развития тканей, органов и систем организма свиней, вовлеченные в развитие эритрона, могут быть использованы для решения актуальных проблем гистогенеза, регенерации и трансплантации тканей и органов; выяснения условий возникновения опухолевых заболеваний; познания регуляторных механизмов развития кроветворных органов.

Для уточнения этиологии и патогенеза различных видов аномалий развития плодов и новорожденных необходимы глубокие знания основ особенностей раннего эмбриогенеза, а также требуется более детальное изучение морфологического строения, развития и функционального становления органов и систем организма, обеспечивающих его защиту и адаптацию при воздействии различных патогенных факторов.

Также предложена модель эритропоэза с использованием свиньи как более близкую к человеку (по сравнению с используемой в настоящее время мышинной моделью).

Роль макрофагов в эритропоэзе сложно переоценить, несмотря на это эмбриональные макрофаги млекопитающих остаются сравнительно мало изученными, а влияние материнских ГМ-КСФ и М-КСФ на эмбриональное развитие и дифференцировку макрофагов эритробластических островков печени и переходу к нормобластическому эритропоэзу у эмбриона свиней не была изучена. Исследование возможности влияния материнских сывороточных уровней колониестимулирующих факторов на пренатальный эритропоэз важен с практической точки зрения, поскольку дает возможность определить корректирующие факторы при врожденных анемиях.

Основные положения выносимые на диссертацию

1. Уточнена периодизация и локализация эритропоэза в онтогенезе свиней.
2. Выявлены основные эритроидные популяции сменяющие друг друга в онтогенезе у свиней.
3. Получены основные структурные, морфологические и морфометрические показатели формирующиеся в развитии эритропоэза свиней.
4. Выявлены структурные, морфологические и морфометрические характеристики

созревания эритропоэза у свиней в онтогенезе.

Основные положения диссертационной работы используются на кафедре цитологии, эмбриологии и гистологии ЕрГМУ им. М. Гераци в материалах лекций, на практических занятиях студентов, а также ординаторами постдипломного обучения.

Апробация. Материалы и основные положения диссертационной работы обсуждены и представлены на заседании кафедры цитологии, эмбриологии и гистологии ЕрГМУ (2015, 2017), на Международной научной конференции «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» Москва 2016; на Ученном Совете НАН РА Института физиологии им. Орбели (2016, 2017); Ассоциации морфологов РА (2017), на Специализированном совете «Теоретическая медицина» ЕрГМУ (2017).

Публикации. Основные положения диссертации изложены в 25 опубликованных научных статьях в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 217 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, материала и методов исследований, 3 главы результатов собственных исследований, обсуждения, выводов и списка литературы, включающего 284 источников литературы. Работа иллюстрирована 23 таблицами, 23 графиками и 47 рисунками.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Эмбриональный гемопоэз

Согласно современной концепции эмбрионального эритропоэза, у млекопитающих возникновение ранних гемопоэтических клеток возможно во всех тканях. Дело в том, что во время эмбрионального развития, гемопоэз происходит сначала в желточном мешке, после чего в аорто-гонадо-мезонефральной области, в печени, в селезенке плода, а затем в костном мозге. Возможность гемопоэза в других частях эмбриона всегда была под вопросом [Sequeira Lopez M.L. et al, 2003; Tavian M., Peault B., 2005].

Долгое время считалось, что образование первичных эритробластов происходит внутри сосудов желточного мешка, стенка которого является первым кроветворным органом у всех млекопитающих [Ghatpane S. et al., 2002]. В желточном мешке формируются полипотентные стволовые клетки, дающие начало всем росткам кроветворения [Kyunghee C, 2002; Zambidis T. et al., 2005, Tada T. et al., 2006; Isern J. et al., 2008; Sheng G., 2010].

В дальнейшем было показано, что первые клетки крови образуются в местах небольших скоплений мезодермальных клеток. Эти клетки играют важную роль в раннем эмбриональном гемопоэзе, встречаясь повсеместно в различных органах и полостях тела, особенно в районе парааортальной мезенхимы. Они впервые появляются в начале гаструляции задолго до морфологически детерминированного развития островков крови. Их количество невелико и больших разрастаний клеток крови, подобных кровяным островкам желточного мешка, в мезенхиме полости тела не формируется [Emura I. et al., 1983]. Это согласуется с предположением, что внезародышевая мезодерма вскоре после выхода из первичной эмбриональной полоски образует примитивные эритроидные линии [Huber T.L. et al., 2004]. Это первый, так называемый ангиобластический период кроветворения [Jaffredo T. et al., 2005, Lu Shi-Jiang et al., 2008], а клетки принято называть гемоангиобластами. Они отличаются большими размерами и у млекопитающих содержат ядра [Godin I., Cумано A., 2005; Tatoyan M. et al. 2016].

Становление кроветворения в онтогенезе млекопитающих проходит ряд этапов, отличающихся не только количественными и качественными параметрами кроветворного процесса, но и его локализацией. По ведущей роли того или иного органа выделяют три

основных периода эмбрионального гемопоэза: мезобластический, гепато-тимо-лиенальный и медуллярный. Наименования их отражают локализацию центров наивысшей кроветворной активности, определяющих картину крови. Периоды следуют один за другим, обеспечивая кроветворную функцию на разных этапах эмбриогенеза.

Мезобластический тип кроветворения возникает в желточном мешке, аллантаоисе, хорионе. Считалось, что первые клетки крови появляются не в теле зародыша, а в мезенхиме стенки желточного мешка [McGrath K.E., Palis J., 2005]. Признаками того, что в стенке желточного пузыря началось развитие крови и кровеносных сосудов является появление в ней отдельных плотных участков из мезенхимы. Эти очаги получили название кровяных островков, а клетки именуется гемангиобластами [Ferkowicz M.J., Yoder M.C, 2005; Zambidis T. et al., 2005; Волчков П.Ю. и соавтр., 2007]. Тем самым подчеркивается, что из них впоследствии развиваются клетки крови и эндотелий сосудов. В некоторых клетках островка появляются признаки секреции – секреторные вакуоли. Содержимое этих вакуолей изливается наружу, раздвигая клетки. Клетки, лежащие в глубине островков, отдаляются друг от друга, теряют связи, округляются и остаются свободно взвешенными в скапливающейся здесь жидкости. Одновременно с этим клетки, занимающие периферическое положение, уплощаются и соединяются своими краями, превращаясь в эндотелиальные клетки стенки сосудов [Yoshimoto M. et al., 2011; Куприкова И.М. с соавт., 2012].

Таким образом, в результате дифференцировки мезенхимы вне тела эмбриона возникают первые сосуды, содержащие взвешенные в плазме примитивные клетки крови. Подобная пластичность и широкие возможности эмбрионального гемопоэза позволяет объяснить, почему при различных патологических условиях, например, при тяжелых формах анемии, экстрамедуллярное кроветворение может возникнуть в любой взрослой ткани

Одновременно с описанными выше процессами, которые имеют место в стенке желточного мешка, похожие процессы происходят в мезенхиме хориона и аллантаоиса. Однако здесь, как правило, образуются не сплошные клеточные скопления, как в кровяных островках желточного мешка, а образующиеся сосуды являются полыми трубками. Образование пупочного канатика относится к ранним стадиям развития зародыша и тесно связано с обособлением тела зародыша от внезародышевых частей и ростом амниона. Основой пуповины в эмбриогенезе является амниотическая ножка, которая представляет

собой мезенхимный тяж, фиксирующий желточный мешок и амнион к внутренней поверхности трофобласта в области расположения будущей плаценты. Затем, в амниотическую ножку врастает полый зачаток аллантаоиса. Одновременно из тела зародыша сюда же проникают аллантаоисные (пупочные) кровеносные сосуды. Пупочные сосуды закладываются и формируются на месте в пупочном стебельке за счет его мезенхимы, одновременно с сосудами в пупочном канатике происходит образование и клеток крови, поэтому пупочный стебелек считается вторым важным внезародышевым кроветворным органом [Дорофиенко Н.Н., 2011]. Сосуды, возникающие в мезенхиме зародыша, объединяются между собой и с сосудами стенки желточного мешка в единую систему. Первые клетки крови появляются как вне сосудов, так и внутри них (рис.1). Но по мере разрастания сосудистой сети интраваскулярное кроветворение становится ведущим [Вагон М.Н. et al., 2012].

Прямое доказательство миграции клеток из желточного мешка внутрь эмбриональной ткани было получено в экспериментах по органному культивированию мышинных эмбрионов. В тканях эмбриона с удаленным желточным мешком после краткосрочного культивирования полностью отсутствуют клетки-предшественники гемопоэза, способные давать колонии в агаре. В то же время желточный мешок, культивируемый без эмбриона, содержит высокое число этих клеток, что говорит об их накоплении при отсутствии миграции в эмбриональные ткани [<http://trimestryberemennosti.ru/plodnoe-jajco/jembrion-bez-zheltochnogo-meshka.html>].

Установлено, что у представителей всех рассмотренных классов в эмбриогенезе формируются две независимые области, в которых возникают гемопоэтические стволовые клетки [Golub R., Cumanо A., 2013]. Экстраэмбриональная “классическая” область представлена желточным мешком или его аналогами, тогда как недавно выявленная интраэмбриональная зона локализации гемопоэтических стволовых клеток включает парааортальную мезенхиму и аорто-гонадо-мезонефральная область [Nishikawa M et al., 2001; Pietila I., Vainio S., 2005; Fu J.R. et al., 2005; Orkin S.H., Zon L.I., 2008; Shannon L. et al., 2009; Isern J. et al., 2010]. Сегодня можно утверждать, что у амфибий и птиц дефинитивные гемопоэтические стволовые клетки происходят из интраэмбриональных источников, тогда как у млекопитающих и человека участие гемопоэтических стволовых клеток желточного

мешка в definitivoном гемопоэзе полностью исключить еще нельзя. Эмбриональное кроветворение в желточном мешке является, по сути, первичным эритропоэзом, для которого характерно сохранение ядра на всех стадиях созревания эритроцитов и синтез гемоглобина фетального типа [McGrath K.E. et al., 2008].

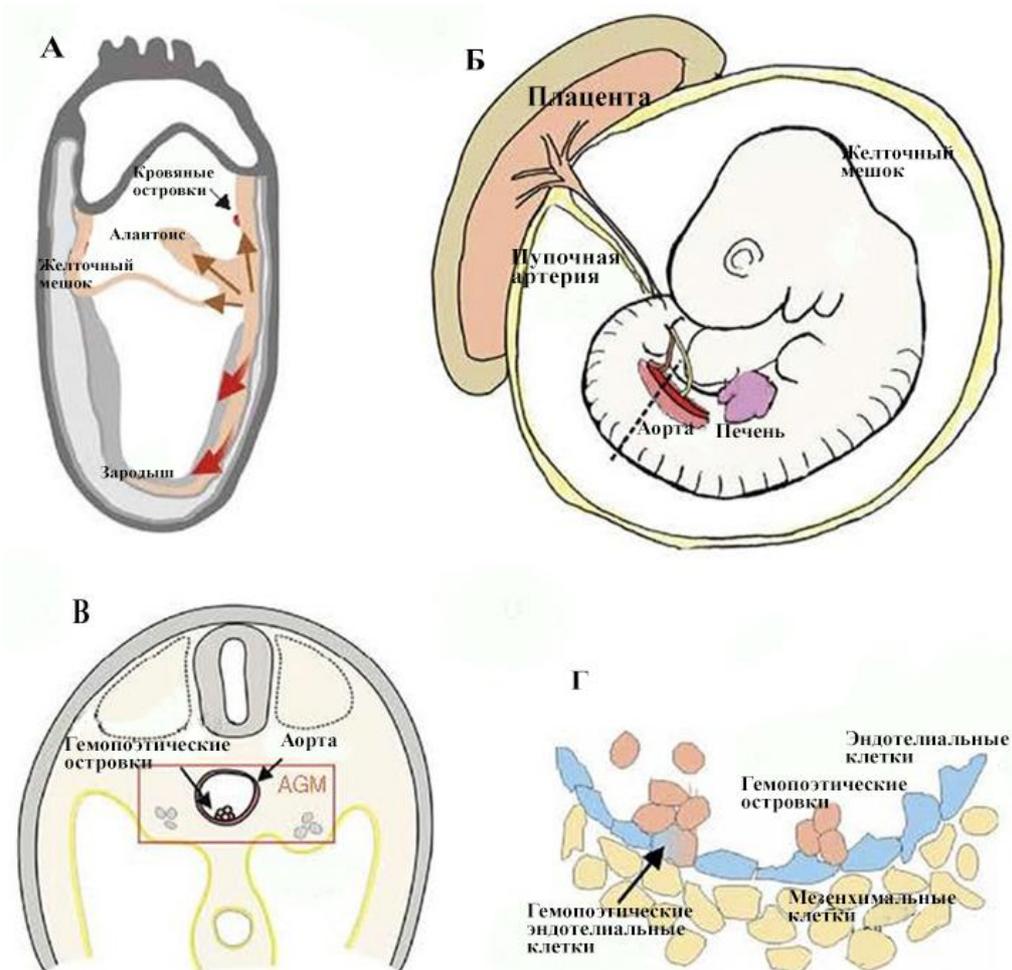


Рисунок 1. Онтогенез гемопоэтической системы мышей [Dzierzak E., Philipsen S., 2013].

А – мезодермальные клетки (черные стрелки) мигрируют в экстраэмбриональные органы (желточный мешок и алантоис) в течении гаструляции мышей. В желточном мешке формируются первичные кровяные островки благодаря мезодерме (розовый) и энтодерме (серый). Миграция мезодермы внутрь зародыша (красные стрелки).

Б – 10,5 сутки эмбрионального развития зародыша мышей. Гемопоэтические клетки обнаруживаются в AGM области, в желточном мешке, пупочной артерии, в плаценте и в печени.

В – поперечный срез AGM области (пунктирные линии) 10.5 суточного зародыша мышей. Гемопоэтические островки (черные стрелки) в вентральной стенке аорты.

Г – показаны гемопоэтические эндотелиальные клетки (черные стрелки), гемопоэтические островки, эндотелиальные клетки (синий) и мезенхимальные клетки (желтые).

Согласно последним данным у человека, волна первичного эритропоэза завершается в желточном мешке на 8-е сутки эмбрионального развития. За ней следует период накопления дефинитивных эритроидных клеток-предшественников – бурстообразующая единица эритроидных клеток (БОЕ-Э), которые образуются исключительно в желточном мешке и впервые появляются на 9-е сутки гестации [Zambidis T. et al., 2005]. На следующей стадии эмбриогенеза уже формируются дефинитивные эритроидные клетки-предшественники – колониобразующая единица эритроидных клеток (КОЕ-Э), а также тучные клетки и колониобразующая единица гранулоцитов и макрофагов (КОЕ-ГМ). Именно на этом основано существование точки зрения, согласно которой дефинитивные клетки-предшественники возникают в желточном мешке, мигрируют с кровотоком, оседают в печени и быстро инициируют первую фазу интраэмбрионального кроветворения [Palis J., Yoder M.C., 2001]. По таким представлениям, желточный мешок можно рассматривать, с одной стороны, как место первичного эритропоэза, а с другой - как первый источник дефинитивных клеток-предшественников гемопоэза в эмбриональном развитии [Palis J., 2008].

Тем не менее, традиционно считалось, что желточный мешок служит единственным источником гемопоэтических стволовых клеток, мигрирующих в кроветворные органы развивающегося зародыша и обеспечивающих дефинитивный гемопоэз у взрослых животных, поскольку появление гемопоэтических стволовых клеток в теле эмбриона совпадает с замыканием сосудистых систем желточного мешка и зародыша [Lux Ch.T. et al., 2008]. В пользу этой точки зрения свидетельствуют данные о том, что клетки желточного мешка при клонировании *in vitro* дают начало гранулоцитам и макрофагам, а *in vivo* - селезеночным колониям [Tsiftoglou S.A. et al., 2009]. Затем, в ходе трансплантационных экспериментов было установлено, что кроветворные клетки желточного мешка, которые в самом желточном мешке способны дифференцироваться только в первичные эритроциты, в микроокружении печени новорожденных и взрослых мышей, опустошенного тимуса или стромального фидера приобретают способность к репопуляции кроветворных органов с восстановлением всех линий гемопоэза даже у взрослых животных-реципиентов. В принципе, это позволяет отнести их к категории истинных гемопоэтических стволовых клеток- как клеток, функционирующих и в постнатальном периоде. Допускается, что желточный мешок, наряду с аорто-гонадо-мезонефральной областью, служит источником

гемопозитических стволовых клеток для дефинитивного кроветворения у млекопитающих, однако до сих пор неясен их вклад в развитие кроветворной системы (рис. 2). Непонятен и биологический смысл существования в раннем эмбриогенезе млекопитающих двух кроветворных органов со сходными функциями [England S.J. et al., 2011; Baron M.H., 2013].

Так, до 2003 года оставалось не выясненным, являются ли клетки аорто-гонадо-мезонефральной области единственным источником быстро растущего пула гемопозитических стволовых клеток фетальной печени. Новые перспективы в решении этого вопроса появились в связи с обнаружением в мышинной плаценте на средних сроках гестации многочисленных мультипотентных клеток-предшественников и гемопозитических стволовых клеток, что указывает на важную роль плаценты в становлении гемопоэза [Barcena A. et al., 2011; Mikkola H.K. et al., 2005; Сериков В.Б., Куйперс Ф., 2008]. Так, к концу внутриутробного развития количество гемопозитических стволовых клеток в плаценте у мышей снижается, что возможно, является отражением процесса миграции плацентарных гемопозитических стволовых клеток в печень и в другие развивающиеся кроветворные органы плода такие как тимус, селезенка и костный мозг. Накопленные данные позволяют предположить, что плацента может функционировать как орган миелопоэза [Lee L.K. et al., 2010; Gekas Ch. et al., 2010; Portilho A.N. et al., 2016].

Среди клеток крови, образующихся в мезобластический период, преобладают крупные первичные эритропоэтические клетки содержащие ядра. Выделяют крупные бласты с базофильной цитоплазмой, с полихроматофильной цитоплазмой, ортохромные бласты с эксцентричным ядром и безъядерные эритробласты. Все эритробласты этого периода называют мегалобластами, а процесс мегалобластическим кроветворением [Алакаева И.Б. и соавтр., 2009].

К концу мезобластического периода возникают очаги нормобластического кроветворения вне сосудов: образуется небольшое количество безъядерных эритроцитов – дефинитивных форм, соответствующих эритроцитам взрослой особи [Kingsley P.D. et al., 2004]. На 7-й–8-й неделе развития эмбриона человека появляются мегалоциты, нормобласты и нормоциты, количество которых к 12-й неделе резко возрастает (до 74%), а мегалобласты практически исчезают. Оксифильные эритробласты утрачивают способность к митотическому делению, в связи с этим описанный тип кроветворения существует непродолжи-

тельное время, и на 3 месяце внутриутробной жизни примитивный эритропоэз у людей практически прекращается.

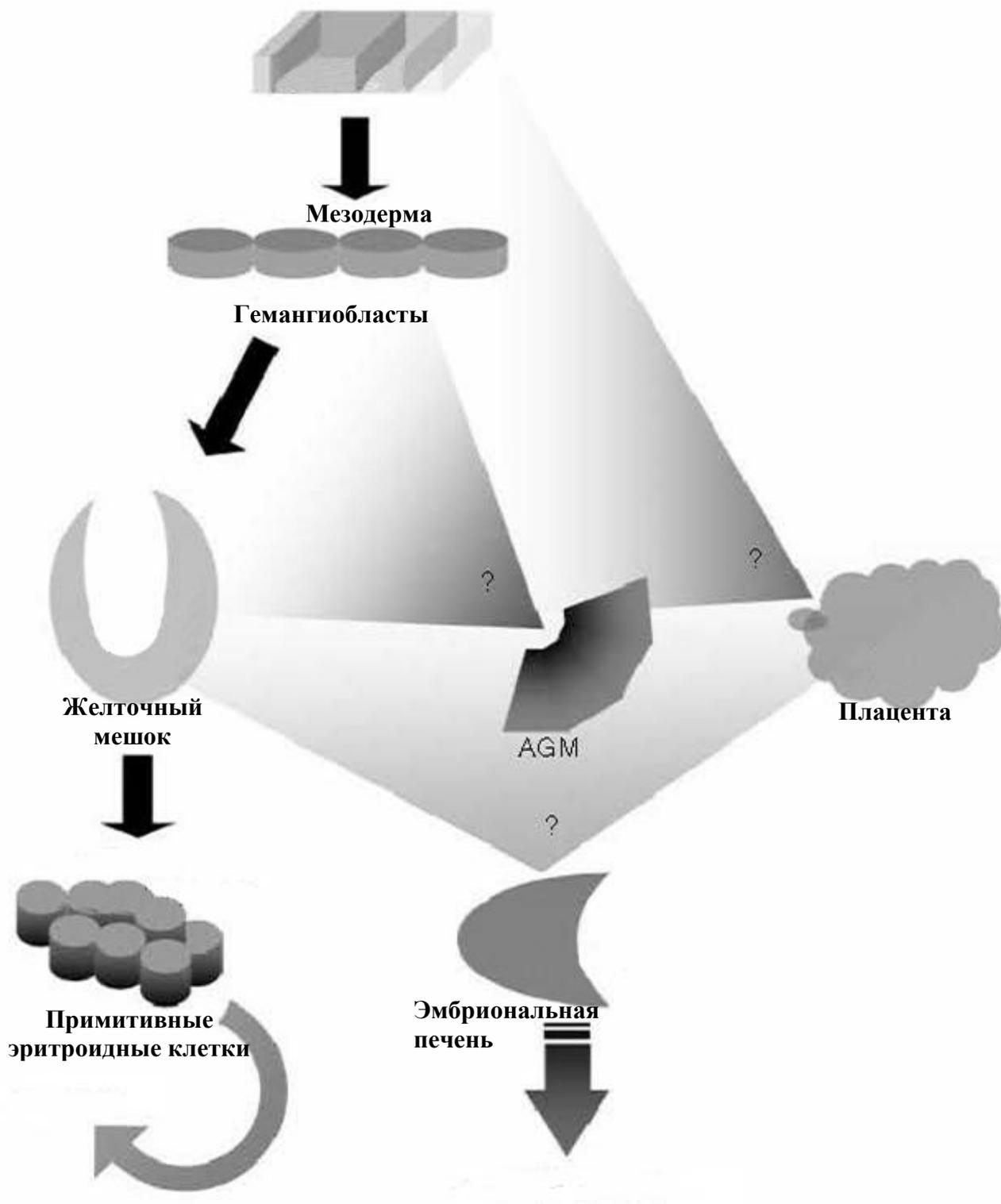


Рисунок 2. Взаимосвязь различных анатомических регионов вовлеченных в эмбриональный гемопоэз [Huang X. et al., 2007]

Гепато-тимо-лиенальный период

Печень закладывается в виде так называемого печеночного дивертикула – выпячивания энтодермы вентральной стенки первичной кишки. В выросте образуются эпителиальные тяжи, между которыми образуются кровеносные сосуды, вокруг них появляются гемопоэтические очаги [Sugiyama D. et al., 2011]. Развитие кровеносных сосудов превалирует над образованием эпителиальных структур печени. Из-за обилия кровеносных сосудов печень в эмбриогенезе является очень крупным органом.

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 [Петренко Ю.А. и соавтр., 2010].

Печень млекопитающих уникальна тем, что в пренатальном периоде онтогенеза в ней параллельно происходят два гистогенетических процесса. С одной стороны, в ходе эмбриогенеза формируется собственно печеночная ткань, с другой – на протяжении значительной части пренатального периода основной функцией органа является кроветворение. Ключевую роль в регуляции этих процессов играет гетерогенная по клеточному составу строма зародышевой печени, организующая микроокружение для дифференцирующихся кроветворных и печеночных стволовых клеток. По-видимому, процессы гепатогенеза и гемопоза оказывают взаимное влияние друг на друга. Об этом свидетельствует, в частности, корреляция между фенотипическими характеристиками гепатобластов или гепатоцитов и активностью кроветворения в печени. Наблюдаемая при электронно-микроскопическом исследовании тесная ассоциация незрелых эритробластов с гепатоцитами, продукция гепатоцитами эритропоэтина и существование линий гепатоцитов, способных поддерживать кроветворение *in vitro*, могут свидетельствовать об участии эпителия развивающейся печени в поддержании ее кроветворной активности [Паюшина О.В. и соавтр., 2012].

В то же время экспансия кроветворения сопровождается подавлением некоторых функций печени, связанных с катаболизмом, иммунной защитой и классическими каскадами комплемента, тогда как другие ее функции, в частности, метаболизм ксенобиотиков и синтез

углеводов с ростом кроветворной активности, напротив, усиливаются [Aiuti A. et al., 1998]. При этом все функции печени значительно усиливаются с началом затухания гемопоэза, которое, возможно, служит сигналом к переключению печени на созревание. С другой стороны, онкостатин-М, продуцируемый кроветворными клетками, способен стимулировать функциональное созревание гепатоцитов и подавлять выработку ими кроветворных факторов, приводя к потере гемопоэтической активности печени на поздних стадиях эмбриогенеза. [Хохлов А.М. и соавтр., 2014].

Источником кроветворения в печени является полипотентная гемопоэтическая стволовая клетка. В мезобластический период из мезенхимы образуется небольшое количество стволовых кроветворных клеток, которые по кровеносным сосудам мигрируют в печень [Kieusseian A. et al., 2012].

Самоподдержание и дифференцировка различных стволовых клеток, присутствующих в печени зародыша, требуют специфического микроокружения, организуемого окружающими клетками и включающего в себя разнообразные растворимые факторы, компоненты внеклеточного матрикса и мембранные молекулы, обеспечивающие межклеточные взаимодействия. К настоящему времени установлено, что главная роль в организации кроветворного микроокружения принадлежит строме – совокупности клеточных элементов мезенхимного происхождения, составляющих остов органа. Судя по результатам экспериментов *in vitro*, стромальные элементы зародышевой печени имеют важнейшее значение для выживания, пролиферации и дифференцировки не только кроветворных, но и печеночных родоначальных клеток [Паюшина О.В. и соавтр., 2012].

Строма зародышевой печени отличается от зрелой по клеточному составу. Это связано как с выполняемыми ею специфическими регуляторными функциями, так и с активно идущими процессами развития самой стромы, требующими присутствия в ней множества стволовых и родоначальных клеток различных мезенхимных дифференциров. Эти клетки дают начало нескольким популяциям, каждая из которых вносит свой вклад в регуляцию кроветворной и, вероятно, гепатоцитарной дифференцировки [Абдулкадыров К.М., Балашова В.А., 2008].

На срезах кроветворящей печени дифференцирующиеся гранулоциты обнаруживаются преимущественно вокруг сосудов портальных триад и под капсулой, тогда как клетки

эритроидного ряда на ранних стадиях дифференцировки тесно контактируют с гепатоцитами, а на более поздних окружают центральные макрофаги эритробластических островков. Мегакариоциты располагаются среди гепатоцитов в контакте с отростками стромальных клеток, а В-лимфоциты и их предшественники рассеяны по паренхиме, не образуя очагов. Такое пространственное распределение кроветворных клеток может свидетельствовать о важной роли стромальных элементов печени в регуляции, прежде всего, гранулоцитарной дифференцировки, тогда как за поддержание эритропоэза, по-видимому, в первую очередь, ответственны клетки печеночной паренхимы [Emura I. et al., 1984; Bielańska-Osuchowska Z, Krzynówek-Wojciechowska J., 1990].

Если рассматривать гемопоэтические стволовые клетки с точки зрения репопуляционного подхода, то особенностью гемопоэтических клеток эмбриональной печени является их способность создавать колонии, которые по размеру значительно превышают таковые при росте гемопоэтических стволовых клеток кордовой крови или костного мозга, причем это относится ко всем типам колоний. Уже этот факт указывает на более высокий пролиферативный потенциал кроветворных клеток эмбриональной печени. Уникальное свойство гемопоэтических клеток-предшественников эмбриональной печени - более короткий по сравнению с другими источниками клеточный цикл, что имеет большое значение с точки зрения эффективности репопуляции органов кроветворения при трансплантации. Анализ клеточного состава гемопоэтической суспензии, полученной из источников зрелого организма, свидетельствует о том, что на всех стадиях онтогенеза ядерные клетки преимущественно представлены окончательно дифференцированными клетками, количество и фенотип которых зависят от онтогенетического возраста донора кроветворной ткани. В частности, суспензии мононуклеарных клеток костного мозга и кордовой крови более чем на 50% состоят из зрелых клеток лимфоидного ряда, тогда как в гемопоэтической ткани эмбриональной печени содержится менее 10% лимфоцитов. Кроме того, клетки миелоидной линии в эмбриональной и фетальной печени представлены преимущественно эритроидным рядом, в то время как в кордовой крови и костном мозге преобладают гранулоцитарно-макрофагальные элементы. Биологическая целесообразность преобладания в эмбриональной печени клеток эритроидного ряда (до 90% общего количества кроветворных элементов) обусловлена необходимостью обеспечения

эритроцитарной массой быстро возрастающего объема крови развивающегося плода [Nanno M. et al., 1994]. В эмбриональной печени эритропоэз представлен ядерными эритроидными предшественниками различной степени зрелости, содержащими фетальный гемоглобин, который благодаря более высокому сродству к кислороду обеспечивает эффективную абсорбцию последнего из материнской крови. Интенсификация эритропоэза в эмбриональной печени ассоциируется с локальным повышением синтеза эритропоэтина (EPO). Примечательно, что для реализации гемопоэтического потенциала кроветворных клеток эмбриональной печени достаточно присутствия одного только эритропоэтина, тогда как для коммитирования к эритропоэзу гемопоэтическим стволовым клеткам костного мозга и кордовой крови требуется комбинация цитокинов и факторов роста, состоящая из EPO, SCF, KOE - ГМ и IL-3 [Elliott S. Et al., 2017]. При этом ранние клетки-предшественники гемопоэза, выделенные из эмбриональной печени, не имеющие рецепторов к эритропоэтину, не отвечают на экзогенный эритропоэтин. Для индукции эритропоэза в суспензии мононуклеарных клеток эмбриональной печени необходимо присутствие более продвинутых эритропоэтин чувствительных клеток с фенотипом CD34⁺CD38⁺, которые экспрессируют эритропоэтин-рецептор.

В литературе до сих пор не сложилось единого мнения о становлении гемопоэза в эмбриональном периоде. Не установлено и функциональное значение существования экстра- и интраэмбриональных источников клеток-предшественников кроветворения. Интраваскулярное кроветворение в большей мере характерно для начального периода кроветворной функции печени и связано с продукцией первичных эритробластов, сходных с таковыми, которые ранее появлялись во внезародышевой и зародышевой мезенхиме. Экстраваскулярные эритроидные клетки морфологически близки к дефинитивным. На этом основании большинство исследователей признают этот ряд клеток нормобластическим. В этом периоде отмечается весьма близкая к дефинитивной пикнотизация ядер в процессе созревания, более медленное накопление гемоглобина и процесс исчезновения ядер. В связи с последним в периферической крови эмбриона появляется все большее количество безъядерных эритроцитов. Гемоглобин эмбрионального типа сменяется на фетальный. Среди клеточных элементов видны проэритробласты, а также базофильные, полихроматофильные и оксифильные эритробласты [Куприкова И.М. и соавтр., 2012].

Таким образом, в печени образуется вторая генерация стволовых клеток, которые заселяют селезенку, тимус и красный костный мозг [Wolber F.M. et al., 2002; Липунова Е.А., Скоркина М.Ю., 2004].

Эмбриональный *тимус* развивается как производное третьего жаберного кармана. Тимический эпителий заполняется блуждающими мезенхимными клетками, которые начинают быстро размножаться и дифференцироваться в лимфоциты. Лимфоциты, образующиеся в этом органе, представляют собой особый класс лимфоцитов со специальной функцией, а именно участие в клеточном иммунитете. Некоторые из мезенхимных клеток дают начало клеткам других линий, таких как эритроциты, гранулоциты, мегакарициты, но это явление преходящее, поскольку основным процессом в тимусе является лимфопоэз [Липунова Е.А., Скоркина М.Ю., 2004].

В развивающейся иммунной системе человека первый и второй триместры беременности выделяются как самые ответственные периоды, определяющие дальнейшее развитие центральных и периферических органов иммуногенеза. Кроме того, в последнее десятилетие стало известно, что наряду с иммунной и гемопоэтической определена и эндокринная функция тимуса. Компоненты тимолина образуются в ретикулоэпителии вилочковой железы эмбриона человека уже на пятой неделе пренатального онтогенеза, т.е. до момента заселения тимуса предшественниками Т-клеток и стволовыми кроветворными клетками. Объединение эндокринной и лимфоцитопоэтической функции тимуса происходит на 7-8 неделе пренатального онтогенеза [Галеева Э.Н., 2011].

Селезенка, как известно в постэмбриональном развитии играет роль кроветворного органа, вырабатывая лимфоциты и моноциты, кроме того она участвует в обмене железа, в ней продуцируются антитела. Закладка селезенки также происходит в конце 1-го месяца эмбриогенеза. Однако процессы гемопоэза в селезенке носят весьма своеобразный характер. Во-первых гемопоэз в селезенке начинается намного позже закладки органа. Во-вторых, из данных литературы следует, что ведущее значение в гемопоэзе в эмбриональной селезенке имеет лимфопоэз [Golub R., Cumanò A., 2013]. Из мигрирующих сюда стволовых клеток происходит экстравазкулярное образование всех видов форменных элементов крови, т.е. селезенка в эмбриональном периоде представляет собой универсальный кроветворный орган. Значение селезенки как эритропоэтического органа часто недооценивается, а между

тем уровень рецепторов к эритропоэтину в селезенке свиней на заключительном этапе пренатального развития превосходит их уровень, как в печени, так и в костном мозге [David R.V. et.al., 2005].

Селезенка формируется у многих млекопитающих раньше, чем в ней обнаруживаются циркулирующие гемопоэтические предшественники. Однако, участие селезенки в процесс кроветворения значительно меньше, чем в печени [Леонтьук А.С., Слука Б.А., 2000].

Некоторые авторы считают, что селезенка играет значительную роль не столько как орган фетального гемопоеза, сколько как место секвестрации и деструкции клеток. При этом, эритропоэз, гранулопоэз, мегакариопоэз и лимфопоэз осуществляются из мигрирующих стволовых клеток. Высокая интенсивность эритро- и гранулопоэза в селезенке сохраняется недолго, миелоидное кроветворение и особенно эритропоэз заметно снижаются, а впоследствии практически прекращаются или сохраняются на очень низком уровне. С формированием красного костного мозга функцию эритропоэза мозг берёт на себя, а селезенка меняет функцию эритропоэза на лимфопоэз и фагоцитирование старых эритроцитов [Озерной Е.В., Шевченко Б.П., 2014]. В отличие от элементов эритроидного кроветворения и гранулопоэза, проявляющих тенденцию к локализации близ венозных синусов, клетки лимфопоэтического ряда группируются вокруг артерий, образуя небольшие скопления расположенные, в основном, на периферии органа. Со временем количество этих юных лимфатических узелков увеличивается, они формируются и в центральных отделах селезенки. Окончательная структура лимфатических узелков формируется, как правило, лишь в постнатальном периоде.

В период кроветворной активности селезенки, когда гемопоез в печени заметно снижается, основным кроветворным органом, определяющим картину крови, становится костный мозг и начинается заключительный этап кроветворения – *медуллярный*.

Трубчатые кости у эмбриона образуются не одновременно. Первоначально формируется хрящевая модель каждой кости. Центральное ядро диафиза впоследствии оссифицируется, и вскоре вслед за вращением мезенхимных клеток из периоста развивается область костной резорбции. Процесс движения мезенхимных клеток сопровождается вращением внутрь капилляров. Постепенно в закладке костного мозга из мезенхимы дифференцируется ретикулярная ткань. В составе стромы появляются ретикулярные волокна, идет интенсивное

развитие широких синусоидных капилляров [Куприкова И.М. и соавтр., 2012].

Количество мезенхимных клеток продолжает увеличиваться за счет непрерывного притока новых клеток, а также делением тех, которые уже находятся внутри недавно сформировавшейся костномозговой полости. Они вырабатывают неклеточный материал или матрикс, заполняющий развивающуюся полость кости. Из этих ранних костномозговых мезенхимных клеток образуются клетки, морфологически сходные с гемоцитобластами печени и желточного мешка. Аналогично последним, они дают начало мегакариоцитам и эритроидным клеткам, а также миелоидным, включая нейтрофилы, базофилы и эозинофилы.

Эмбриональный костный мозг заметно отличается от центров более раннего развития гемопоэза тем, что образование миелоидных клеток идет здесь особенно энергично и доминирует в гемопоэзе. Процесс формирования ранних миелоидных клеток или миелопоэз начинается в центральной части костномозговой полости и распространяется оттуда, чтобы в конечном счете захватить всю полость кости. Эритропоэз в эмбриональном костном мозге развивается немного позже и в основном смешивается с процессом миелопоэза, так что среди большинства созревающих клеток миелоидной линии можно наблюдать малые очаги эритропоэза. Костный мозг на этой стадии развития называют первичным или остеобластическим, который становится центральным органом, осуществляющим универсальный гемопоэз, и остается им в течение постнатальной жизни [Липунова Е.А., Скоркина М.Ю., 2004; Romaniuk A. et al., 2016].

1.2. Постэмбриональный гемопоэз и его регуляция

Как известно, основной функциональной чертой постэмбрионального гемопоэза является продукция огромного количества клеточных элементов в единицу времени, что объясняется гибелью соответствующего числа клеток крови в процессе жизнедеятельности и выполнения ими своих функций. Дополнительная потребность в зрелых клетках, возникающая при разных видах патологии, приводит к повышенному напряжению системы крови и, в частности, к массивному потреблению гемопоэтических предшественников, необходимых для возмещения убыли клеток в ее нижележащих по иерархии отделах. Функционирование кроветворной ткани, адекватное запросам организма в различных условиях, возможно благодаря существованию строго организованных дистантных и коротко ранговых систем контроля [Дыгай А.М., Жданов В.В., 2012].

В частности, сейчас понятен физиологический смысл существования локальных механизмов, обеспечивающих количественную регуляцию гемопоэза на уровне коммитированных и частично детерминированных предшественников и ограничивающих реакцию полипотентных стволовых кроветворных клеток на дальноранговые нервные и гуморальные стимулы [Воробьев Д.И., 2002].

В отличие от других клеточных формирований, накопление которых связано с увеличением числа клеток себе подобных, в кроветворной ткани этот процесс происходит благодаря длительному поддержанию кроветворения, в процессе которого пролиферация преобладает над дифференцировкой. В противном случае происходит терминальная дифференцировка, ведущая в процессе длительного культивирования к неминуемой гибели клеток [Билько Н.М. и соавтр., 2003; Cumanò A., Godin I., 2007].

Имеющиеся данные о функционировании системы крови в норме и при патологии свидетельствуют о том, что в условиях сбалансированного гемопоэза нейроэндокринные субстанции не оказывают прямого влияния на пролиферацию и дифференцировку кроветворных клеток. В таких условиях система работает во многом автономно, и основную роль в ее регуляции играют локальные механизмы. При экстремальных же состояниях, сопровождающихся развитием компенсаторных процессов в системе крови, ведущее значение в поддержании гемопоэза на повышенном уровне принадлежит нейроэндокринным контролирующим структурам.

Не вызывает сомнения тот факт, что наблюдаемые при действии различных болезнетворных факторов изменения со стороны системы крови и механизмы, лежащие в их основе, во многом неспецифичны и однотипны. Тем не менее конкретная реакция системы крови определяется природой действующего раздражителя. Так, если в условиях иммобилизационного стресса имеет место равномерная стимуляция костномозгового эритро- и грануломоноцитопоэза, то при воспалении преобладают изменения со стороны белой крови, что объясняется ключевой ролью нейтрофилов, тучных клеток и моноцитов в развертывании и разрешении воспалительного процесса. Однако острое воспаление, как и другие стрессорные реакции, сопровождается также активацией эритропоэза, в основе которой лежит усиление функциональной активности гемопоэзиндуцирующего микроокружения (увеличение продукции короткоранговых гуморальных стимуляторов пролиферации и

дифференцировки эритроидных предшественников) и системы эритропоэтина сыворотки крови [Дыгай А.М., Жданов В.В., 2012].

С другой стороны, при гипоксиях различного генеза отмечается активация эритрона и кроме, закономерного повышения концентрации эритропоэтина в сыворотке крови происходит активация Т-лимфоцитарных и макрофагальных механизмов регуляции эритропоэза в их взаимодействии.

Клеточное равновесие в системе крови обеспечивается тремя уровнями системной организации кроветворения: стромальное микроокружение, стволовые клетки и ростовые факторы.

Гемопозитическое микроокружение относится к стромальным элементам органов, в которых происходит гемопоэз, его формируют клеточные и внеклеточные элементы, образующие структурный матрикс, где стволовые клетки и их потомки пролиферируют и дифференцируются по перемещению в кровоток стромы, образующих его микроокружение.

Структурный матрикс или подстилка из клеток, это гетерогенная группа клеток, располагающихся в костномозговой полости, является производной мезенхимы и состоит из большого количества высокоспециализированных клеток - адипоцитов, фибробластов, эпителиальных, адвентициальных, ретикулярных клеток и макрофагов [Li Z., Li L., 2006]. Кость, ее балки и трабекулы, клеточными элементами которых являются остеобласты, остеокласты и остециты, образуют главную опорную структуру, ограничивающую зоны кроветворения [Чайлахян Р.К., Герасимов Ю.В., 2004]. Производным стромы является и внеклеточный матрикс, включающий коллагеновые и ретикулярные волокна, а также серию нерастворимых белков - фибронектин, ламинин, тромбоспонин, тенасцин, гликозаминогликаны и др.

Процесс кроветворения в костном мозге схематично можно представить следующим образом: костные трабекулы, клетки стромы и прежде всего ретикулярные, эндотелиальные и адвентициальные клетки образуют в костях полости, ниши или синусоиды, в которых в виде гроздьев размещаются кроветворные клетки [Suda T. et al., 2005]. Это отдельные клоны, содержащие клетки различной степени зрелости. Ниши не омываются кровью, и система полностью замкнута [Kaplan R.N. et al., 2007]. Ниши являются смежными с венозными синусами, у них общие стенки, выстланные со стороны венозного синуса эндотелием, а со

стороны гемопоэтических ниш - адипоцитами, клетками адвентиция, между которыми находится базальная мембрана [Arai F. et al., 2005]. Созревшие клетки крови двигаются к стенке синуса, обходя адвентициальные клетки. Под действием некоторых цитокинов, например интерлейкина-8 и эндотоксина отростки адвентициальных клеток могут сокращаться, увеличивая тем самым площадь соприкосновения клеток крови с эндотелиальными клетками. Затем, клетки крови плотно «прилипают» к эндотелиальным клеткам. Это сложный процесс, в котором участвуют специфические молекулы межклеточного взаимодействия: интегрины, селектины, эндотелиальные молекулы адгезии [Владимирская Е.Б., 2015]. Так как у млекопитающих гемопоэз происходит во внесосудистом пространстве между синусами, то созревшие клетки для миграции в кровь должны пройти через стенку синуса, состоящего из сплошного слоя эндотелиальных клеток. Для этого в цитоплазме эндотелиальных клеток находятся отверстия в 1-2 мкм, через которые клетки могут проходить, если обладают достаточной эластичностью. Клетки с поврежденными или потерявшими эластичность мембранами не могут пройти через отверстия и расщелины в стенке и гибнут. Например, в прохождении нормобластов через стенку принимают участие макрофаги, освобождающие нормоцит от ядра. Мегакариоциты плотно прижаты к промежуткам между клетками стенок, их цитоплазма в виде отростков выпячивается в эти трансмуральные отверстия и отделяет в просвет венозного синуса тромбоциты [Tober J. et al., 2007]. В норме только зрелые, функционально полноценные клетки крови проходят через барьер и попадают в кровеносное русло [Липунова Е.А., Скоркина М.Ю., 2004].

Гемопоэтические клетки находятся в тесном контакте с клетками стромы. Способность гемопоэтических клеток распознавать соответствующие клетки стромы и размещаться в своих определенных зонах (хомминг) обусловлена молекулами клеточной адгезии, интегринными и непосредственными межклеточными контактами [Jin-Xiang F. et al., 2004]. Это свойство кроветворных клеток отчетливо проявляется при внутривенной трансплантации костного мозга: 85% введенных клеток попадает в костный мозг, который составляет всего 6% от массы тела, оставшиеся 15% распределяются между печенью, легкими, селезенкой и другими органами [Уфимцева А.И., Канов Е.В., 2012].

В онтогенезе у некоторых млекопитающих в диафизах трубчатых костей происходит

постепенное замещение красного костного мозга жировой тканью. Обычно интенсивность кроветворения обратно пропорциональна количеству жировых клеток. Однако жировой костный мозг превращается в кроветворный в условиях сильного гемопозитического стресса, например, при анемии. Жировые клетки костного мозга не являются жировым депо организма, так как при голодании содержание жира в них не снижается, они несут какие-то связанные с кроветворением функции и являются его необходимым элементом.

Регуляция гемопоза - сложный многоступенчатый процесс, обеспечиваемый стромальными факторами, которые продуцируются непосредственно клеточным микроокружением, а также гормонами, витаминами и гемопозитическими факторами, вырабатываемыми в других органах (тимус, печень, почки). Регуляторный эффект стромального микроокружения костного мозга осуществляется путем прямых контактов стромальных клеток с кроветворными предшественниками, а также посредством нарабатываемых стромой гуморальных факторов стимуляции и ингибирования процессов пролиферации и дифференцировки гемопозитических стволовых клеток (рис. 3). Сложная сеть сигнальных путей регуляции гемопозитических стволовых клеток в настоящее время служит предметом интенсивных исследований [Семенова Н.Ю. и соавтр., 2014].

Начало активного функционирования стволовой клетки, связанное с выходом из фазы G₀-клеточного цикла, как и выбор ею направления дифференцировки, видимо, специально не регулируются и представляют собой стохастические и, следовательно, исключительно надежные процессы. В эволюции подобные стохастические (случайные) процессы всегда используются при особо важных для судьбы вида решениях: выбор пола, мобилизация в клеточный цикл яйцеклеток и др [Воробьев Д.И., 2002].

Стволовые кроветворные клетки (СКК) не чувствительны к запросу и даже сильнейшие гемопозитические стрессы, такие, как кровопотеря, облучение, химиотерапия не способны к увеличению доли клеток, находящихся в клеточном цикле. По мере дифференцировки чувствительность стволовых кроветворных клеток к внешним факторам постепенно возрастает. На первых этапах регуляция стволовых кроветворных клеток исключительно близкодействующая и осуществляется взаимодействием стволовых кроветворных клеток со стромальным микроокружением, с которым они находятся в прямом контакте [Воробьев Д.И., 2002].

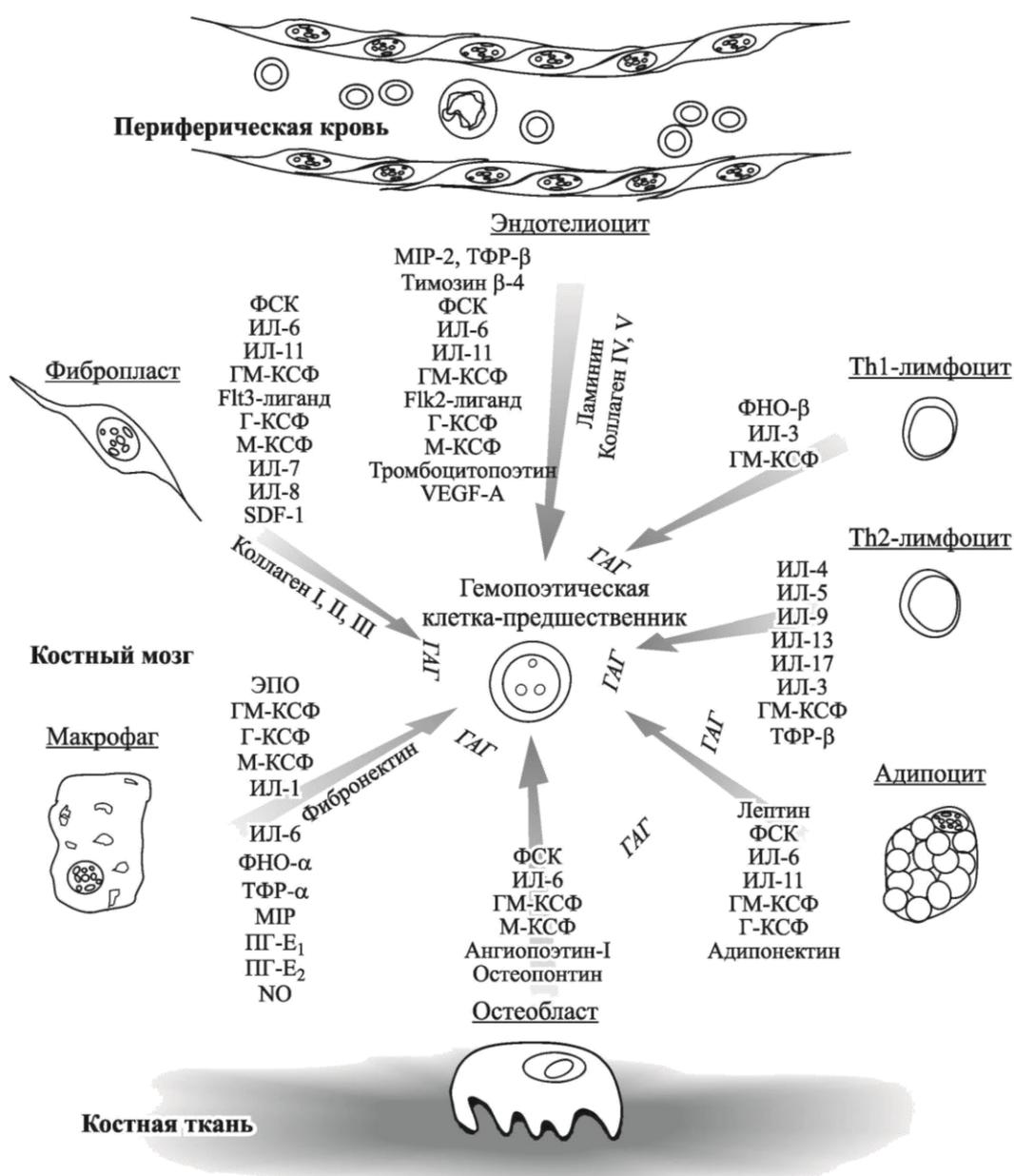


Рисунок 3. Роль гемопоэзинулирующего микроокружения в регуляции кроветворения [Дыгай А.М., Жданов В.В., 2012] .

- ФСК* – фактор стволовой клетки (фактор Стила);
- ИЛ* – интерлейкины (1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 13, 17);
- Г-КСФ* – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор;
- ГМ-КСФ* – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор;
- М-КСФ* – макрофагальный колониестимулирующий фактор;
- ЭПО* – эритропоэтин;
- SDF-1* – фактор, продуцируемый стромальными клетками – 1;
- ФНО-α (β)* – фактор некроза опухолей α (β);
- ТФР-α (β)* – трансформирующий фактор роста α (β);
- МIP* – макрофагальный воспалительный белок;
- ПГ* – простагландины; *NO* – оксид азота;
- VEGF* – везикулярный эндотелиальный ростовой фактор

Эффекторными молекулами такой регуляции являются ростовые факторы, интерлейкины и ингибирующие факторы. Важную роль в ней играют белки внеклеточного матрикса, которые, с одной стороны, являются морфологическим субстратом для локализации стволовых кроветворных клеток, а с другой, избирательно адсорбируют определенные ростовые факторы в необходимых концентрациях. Для выживания стволовых кроветворных клеток в состоянии покоя важно наличие достаточной концентрации таких факторов, как SCF, ФЛТ-3-лиганд, тромбопоэтина и некоторых других. Эти же факторы необходимы и для пролиферации стволовых кроветворных клеток. Наоборот, торможение выхода стволовых кроветворных клеток в клеточный цикл регулируется ингибиторами - такими, как лейкемия ингибирующий фактор (LIF), трансформирующий фактор роста- β (ТФР- β), воспалительный белок макрофагов, фактор некроза опухолей (ФНО) и т.д. [Павлова А.А. и соавтр., 2013].

По мере продвижения вдоль по дереву кроветворных дифференцировок стохастическая, не чувствительная к запросу пролиферация стволовых кроветворных клеток заменяется на дальнодействующую, регулируемую сывороточным уровнем ростовых факторов, что и обуславливает возможность количественной регуляции кроветворения. Клетки приобретают чувствительность к гуморальным факторам, на которые они способны отвечать и вне структур кроветворного микроокружения. Именно на этом свойстве основаны методы их определения – образование колоний в вязкой среде под влиянием присутствующих в среде ростовых факторов [Медведев С.П. и соавтр., 2010].

Наличие двух фаз регуляции кроветворения запроснезависимой на уровне стволовых кроветворных клеток и чувствительной к запросу на уровне всех более зрелых предшественников, включая морфологически распознаваемые, обеспечивает два замечательных свойства процесса кроветворения. Во-первых, неистощимость его в условиях сколь угодно сильного запроса, за счет сохранения регулируемых только стохастически СКК, и запроснезависимых, которые восстанавливают всю кроветворную систему после ее гибели или расходования зрелых клеток. Во-вторых, возможность быстрого количественного ответа, который осуществляется более зрелыми, чем СКК, предшественниками, и обеспечивающего увеличенную продукцию зрелых клеток нужного вида в случае запроса. Такой принцип регуляции кроветворения позволяет понять биологический смысл одновременного функционирования множества небольших короткоживущих клонов при равновесном кроветворении [Воробьев Д.И., 2002].

Многочисленные исследования последних лет показывают, что ростовые факторы необходимы для жизнедеятельности всех клеток крови. Эти внешние воздействия связывают клетки с микроокружением и поддерживают в активном состоянии внутриклеточные механизмы, обеспечивающие различные виды их активности. При этом, характер ответа на ростовой фактор зависит от самих клеток: экспрессии цитокиновых рецепторов, особенностей формирования и проведения цитокиновых сигналов и генетических возможностей клетки. Чем больше рецепторов разных видов имеет кроветворная клетка, тем шире у нее спектр жизненно важных программ, возможных для осуществления. Можно предположить, что именно поэтому у стволовых кроветворных клеток и ранних клеток-предшественниц обнаруживается высокая плотность рецепторов всех классов цитокинов. Действие цитокинов служит лишь необходимым стимулом для реализации тех программ в клетках, которые генетически предопределены программой дифференцировки и стадией созревания [Павлова А.А. и соавтр., 2013].

Гемопоэтические факторы роста – это большое «семейство» цитокинов, ответственных за регуляцию пролиферации, дифференцировки и функциональных особенностей всех ростков гемопоэза. К настоящему времени выделено более 20 таких цитокинов, воздействие некоторых из них оценено в клинических испытаниях последнего десятилетия. Многие из этих цитокинов играют важную роль не только в гемопоэзе, но и в других биологических процессах, например, в иммуномодуляции, в острых воспалительных реакциях. В то же время часть из этих цитокинов выполняет функции аутокринных или паракринных факторов роста опухоли. Более того, известны также ингибиторы гемопоэза, которые играют важную роль в патогенезе заболеваний. Некоторые из таких цитокинов апробированы в клинических испытаниях в качестве препаратов, снижающих количество активно делящихся гемопоэтических клеток до введения цикло- и фазоспецифичной химиотерапии [Гольберг Е.Д. и соавтр., 2001].

Наиболее известные из гемопоэтических факторов роста, зарегистрированные для использования в клинической практике во всем мире: колониестимулирующие факторы (КСФ) – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ) и грануломоноцитарный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) [Подольцева Э.И., 2001; Морозова И.В., Трещалина Е.М., 2005; Куртова А.В. и соавтр., 2007; Бозо И.Я., 2009; Скрыпник К.А., Косоруков В.С., 2011; Hiroaki H. et al., 2001].

Действительно, в кроветворной системе в каждый данный момент присутствует множество кроветворных предшественников, далеко не исчерпавших свой пролиферативный потенциал и способных к немедленному и интенсивному ответу на кроветворный запрос. Например, после облучения число колониестимулирующих единиц может возрасти в 10000 раз, что способствует быстрому, в течение нескольких дней, восстановлению нормальной популяционной структуры кроветворной ткани. При равновесном кроветворении используется очень небольшая часть доступных предшественников. Большая их часть элиминируется либо за счет гибели в результате апоптоза, либо в результате малого числа делений, прodelываемых в процессе терминальной дифференцировки.

Таким образом, системы локальной и дальнедействующей регуляции кроветворения обеспечивают не только избыточность регуляторных взаимодействий, но и их очень точный результат. Как в норме, так и при различных стрессорных воздействиях, мириады делящихся кроветворных клеток самых разных линий дифференцировки в итоге очень точно удовлетворяют потребности организма в данный момент в клетках того или иного вида.

При действии на организм различных по своей природе экстремальных факторов, как обладающих миелоингибирующим действием, так и не вызывающих гипоплазии кроветворной ткани, происходит последовательная активация отдельных звеньев единого каскадного механизма регуляции кроветворения. Пусковым звеном, определяющим адаптивный ответ кроветворной ткани, при этом являются центральные нейро-эндокринные механизмы, реализующие свое влияние посредством универсальных стресс-реализующих (вегетативной, гипофиз-адреналовой, опиоидных пептидов) и стресс-лимитирующих систем (гамкергической, опиоидных пептидов и др.). Основным звеном, реализующим вегетативные влияния на гемопоэз, является симпато-адреналовая система (при этом существует определенная тропность бета-адренергических стимулов к эритроидным, альфа-адренергических – к гранулоцито-макрофагальным механизмам кроветворения). Активация гипофиз-адреналовой и симпато-адреналовой систем приводит к развитию феномена гиперплазии кроветворной ткани костного мозга и увеличению клеточности периферической крови. В основе активации гемопоэза при этом лежит усиление миграции Т-лимфоцитов регуляторов в костный мозг под действием глюкокортикоидов и катехоламинов. Элементы гемопоэзиндуцирующего микроокружения (макрофаги, стромальные механоциты) в

кооперации с Т-лимфоцитами определяют пролиферативный и дифференцировочный статус кроветворных клеток-предшественников посредством усиления продукции гуморальных регуляторов (цитокинов, гликозаминогликанов) и межклеточных взаимодействий, приводящих к усилению формирования клеточных ассоциаций -гемопоэтических островков [Дыгай А.М., Жданов В.В., 2012].

Молекулярные основы регуляции кроветворения интенсивно разрабатываются только в последние годы, когда появился метод направленного мутагенеза, позволяющий избирательно выключить тот или иной ген в тотипотентной эмбриональной стволовой клетке мыши [Воробьев Д.И., 2002]. Последующее использование таких клеток для получения трансгенных животных, в которых инактивирован во всех тканях определенный ген, или для культур, в которых происходят кроветворные дифференцировки, позволило получить важные данные об участии тех или иных генов в процессах развития и регуляции кроветворной системы. Нужно, однако, учитывать, что эта революционная техника позволяет судить только о том, какие изменения фенотипа произошли в клетках, органах и системах организма. Понятно, что такие данные не обеспечивают понимания механизмов функционирования выключенных генов, так как само по себе выключение гена на ранних стадиях развития приводит к блокаде всех последующих шагов дифференцировки, и какие из них играют какую роль в конечном результате часто остается невыясненным.

Необходимо добавить, что функции факторов транскрипции модулируются множеством эффектов, включая сигналы цитокинов и ростовых факторов, межклеточные взаимодействия, позиции в клеточном цикле и т.д. Именно эти механизмы очень интенсивно изучаются в последние годы и именно тут можно ждать решающих прорывов в расшифровке того, как начинается экспрессия ключевых факторов транскрипции в кроветворных предшественниках: стохастический ли это процесс или тонко регулируемый ответ на внешние сигналы, каковы механизмы функционирования факторов транскрипции в регуляторной сети, приводящие к упорядоченному выбору направления дифференцировки и развитию кроветворной системы. Можно не сомневаться, что ответы на многие из этих увлекательнейших вопросов будут получены в ближайшее время [Воробьев Д.И., 2002].

1.3. Номенклатура клеток костного мозга и крови

Открытие стволовых клеток считается одним из важнейших достижений человечества. Его ставят в один ряд с такими грандиозными событиями в науке, как расшифровка генома человека и открытие двуспиральной цепочки дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Способность любых стволовых клеток давать разные клеточные типы делает их весьма удобной системой для изучения молекулярно-генетических событий, обуславливающих дифференцировку клеток. Благодаря своей способности дифференцироваться в любую ткань, стволовые клетки могут применяться для лечения огромного количества заболеваний. Поэтому всестороннее изучение стволовых клеток является одной из актуальных и перспективных областей современной медицины [Нимер С.Н., 2009; Huang X. et al., 2007].

Активное применение стволовых кроветворных клеток в клинической практике изменило традиционный взгляд на лечение целого ряда нозологий. Сегодня широкое использование высоких доз цитостатиков и/или облучения с последующей реинфузией (трансплантацией) аутологичных стволовых кроветворных клеток определяет современный подход к лечению ряда онкогематологических и врожденных заболеваний [Моталкина М.С., 2016; Лазебник Л.Б. и соавтр., 2012; Мелкова К.Н., 2012; Калязина Н.Ю., Зенкин А.С., 2013; Двирнык В.Н. и соавтр., 2014; Грицаев С.В. и соавтр., 2015].

С помощью клональных, иммунологических, электронно-микроскопических, генетических и радиобиологических методов за последние 25 лет получены важные данные, характеризующие кинетику клеточных популяций в процессе кроветворения. Отражением этого явилось построение новых схем кроветворения, в которых уточнены ранние стадии гемоцитопоза, когда разделение клеток по морфологическим признакам еще невозможно. В настоящее время всю общность гемопоэтических клеток во взрослом организме весьма условно подразделяют на 5-6 этапов дифференцировки, границы которых размыты и содержат много переходных промежуточных форм. В процессе этих дифференцировок происходит постепенное снижение пролиферативной активности клеток и их потентности, т. е. способности развиваться сначала во все кроветворные линии, а затем во все более ограниченное количество линий.

Огромная клеточная продукция в кроветворной системе привела к представлению о существовании в ней специальных предшественников, способных созреть до стадии зрелых неделящихся клеток, но, в отличие от всех других соматических (т.е. не половых) клеток, они способны в результате деления образовывать дочерние клетки, полностью идентичные родительской (включая не сниженный в результате деления пролиферативный потенциал) и способными к неограниченному размножению.

С другой стороны, родоначальная клетка должна быть полипотентной, т.е. обладать способностью к разнообразным кроветворным дифференцировкам. Эта клетка была названа стволовой кроветворной клеткой, по аналогии со стволом дерева, из которого развиваются ветви [Абдрахманов И.К., 2005].

I - Стволовые кроветворные клетки- морфологически не распознаваемая клетка, соответствует малому лимфоциту, маркерной молекулой этих клеток является CD34, экспрессируемая и эндотелиоцитами сосудов. [Чеснокова Н.П. и соавтр., 2012]. Стволовая кроветворная клетка является полипотентной, то есть способной одновременно дифференцироваться во все виды клеток крови и пролиферировать для сохранения постоянства своего количественного состава, поскольку в постнатальный период отсутствует пополнение этого пула извне [Абдрахманов И.К., 2005]. В эмбриональном периоде эмбриональные стволовые клетки экспрессируют гены, индуцирующие дифференцировку в направлении гемопоэза, что инициирует возникновение стволовых кроветворных клеток и начало кроветворения [Гривенников И.А., 2008; Григорян А.С., Кругляков П.В., 2008]. В отличие от тотипотентной клетки стволовые кроветворные клетки не обладают неограниченным пролиферативным потенциалом и не являются бессмертными. Возможно, что нелимитированное самовозобновление и бессмертность стволовых кроветворных клеток явились бы условием, угрожающим их жизни, так как подобные клетки скорее подвержены неоплазии [Воробьев Д.И., 2002].

При сокращении общего числа стволовых кроветворных клеток ниже критической величины в результате токсического воздействия, например ионизирующего излучения или химиотерапии, стволовые клетки прекращают дифференцировку, сохраняя только способность к самообновлению до достижения их начальной клеточной массы. Именно этим объясняется цитопения после облучения и химиотерапии, а также высокая эффективность

пересадки стволовых клеток в такой ситуации [Протопопова Н.В. и соавтр., 2007].

Направление дифференцировки стволовой клетки определяется уровнем содержания в крови данного форментного элемента, а также влиянием микроокружения стволовых клеток - индуктивным влиянием стромальных клеток костного мозга или другого кроветворного органа [Sugiyama D. et al., 2016]. Поддержание численности популяции стволовых клеток обеспечивается тем, что после митоза стволовой клетки одна из дочерних клеток становится на путь дифференцировки, а другая принимает морфологию малого лимфоцита и является стволовой. Делятся стволовые клетки редко (1 раз в полгода), основная масса стволовых кроветворных клеток находится в состоянии G₀-клеточного цикла. При выходе из состояния покоя клетка необратимо вступает на путь дифференцировки, постепенно снижая как пролиферативный потенциал, так и ограничивая набор возможных дифференцировок. В большинстве случаев этот процесс непрерывен, однако некоторые из стволовых кроветворных клеток возвращаются в состояние покоя после проделывания 1-3 делений. Такие вернувшиеся в резервный пул стволовые кроветворные клетки не равноценны исходным, непролиферировавшим СКК, их состояние покоя менее глубоко и при наличии запроса они способны ответить на него гораздо быстрее, приобретая маркеры определенных линий дифференцировки в культуре за 1-2 дня, тогда как исходные стволовые кроветворные клетки требуют для этого 10-14 дней. Следовательно, стволовые кроветворные клетки, т.е. клетки, способные существовать на протяжении всей жизни, могут быть разделены на 2 подраздела:

а) стволовые кроветворные клетки, не пролиферировавшие в постнатальной жизни и способные продуцировать большие клоны, субклоны которых могут быть выявлены на протяжении всей жизни и

б) клетки, вернувшиеся в состояние менее глубокого G₀-периода после кратковременной пролиферации; такие клетки могут начать клонообразование в самое разное время после повторного вхождения в стадию покоя, даже равное всей жизни особи, однако они продуцируют только небольшие клоны, не возвращаются в состояние покоя, и произведенные ими клоны живут только короткое время.

Границы между этими категориями размыты, т.е. некоторые короткоживущие предшественники имеют достаточно высокий пролиферативный потенциал, обеспечи-

вающий более длительное их функционирование. Такое устройство отдела стволовых клеток имеет очевидный биологический смысл. Длительное поддержание кроветворения обеспечивается стволовыми кроветворными клетками, находящимися, в глубоком резерве, тогда как необходимость срочного ответа на запрос удовлетворяется за счет стволовых кроветворных клеток, уже прошедших основную дистанцию на пути от G_0 к G_1 и находящихся в состоянии быстро мобилизуемого резерва. В случае повышенного запроса на кроветворение можно гораздо быстрее удовлетворить его за счет созревания многих предсуществующих предшественников, обладающих чувствительностью к запросу, чем начинать ответ с самого начала, с немногих СКК, которым нужно длительное время (не менее 3-4 недель) для созревания до стадии колониеобразующей единицы.

В целом можно считать установленным, что стволовые кроветворные клетки обладают высоким, но не безграничным пролиферативным потенциалом; они не бессмертны, т.е. не могут "самоподдерживаться". Стволовые кроветворные клетки закладываются только в эмбриогенезе и расходуются последовательно, образуя короткоживущие, локально расположенные, сменяющие друг друга клеточные клоны.

Во взрослом организме наибольшее количество стволовых клеток находится в красном костном мозге (на 100000 клеток костного мозга приходится около 50 стволовых), из которого они мигрируют в тимус, селезенку, а у птиц в фабрициеву сумку.

Такие факторы, как облучение, полихимиотерапия, гипербарическая оксигенация способны индуцировать миграцию стволовых кроветворных клеток из костного мозга в кровь. Феномен миграции стволовых кроветворных клеток в постнатальном периоде заключается не только в поддержании функции гемопоэза, но и в поддержании достаточного количества необходимых для физиологической и репаративной регенерации стволовых кроветворных клеток в органах и тканях [Александров В.Н., Сергеев В.С., 2006].

В регенеративной клеточной терапии используются эмбриональные и зрелые (постнатальные) стволовые клетки, поскольку те и другие обладают необходимым пролиферативным и, следовательно, регенеративным потенциалом. Проллиферативный потенциал эмбриональных стволовых клеток существенно выше, чем у стволовых кроветворных клеток взрослого организма. Однако чрезмерная плюрипотентность и пролиферативная способность эмбриональных стволовых клеток требуют тщательного

контроля поведения импланта после пересадки из-за повышенной иммуногенности и потенциальной канцерогенности этих клеток. Также существенным недостатком использования эмбриональных стволовых клеток для заместительной терапии является этическая сторона вопроса [Лызииков А.Н. и соавтр., 2015].

II- Полустволовые клетки – являются частично детерминированными, т. е. способность их к дифференцировке сужается. Это популяция полустволовых клеток с более ограниченными способностями к самоподдержанию: при делениях вновь образуются два вида дочерних клеток – как идентичные материнским, так и более дифференцированные. Но первых теперь меньше 50%, поэтому убыль исходных клеток полностью не компенсируется. От последующих же клеток полустволовые клетки отличаются тем, что еще сохраняют возможность дифференцироваться не по одному, а по двум различным направлениям, т.е. являются олигопотентными. Так, к полустволовым клеткам относятся предшественники миелопоэза и предшественники лимфопоэза. На агаровой культуре эти клетки образуют колонии, поэтому они получили название "колониеобразующие единицы" - КОЕ. Именно эти клетки приобретают чувствительность к регуляторам гемопоэза, которые определяют направление дифференцировки из олигопотентных полустволовых клеток в следующий, третий класс - "унипотентные клетки-предшественницы", которые обладают еще меньшими способностями к самоподдержанию, и регулируются действием специфических биологически активных веществ - *поэтинов*.

III- Унипотентные клетки, способны к дифференцировке в направлении различных ростков - клетка-предшественница грануло- и моноцитопоэза (КОЕ - ГМ), клетка гранулоцито- и эритроцитопоэза (КОЕ - ГЭ), клетка мегакариоцито- и эритроцитопоэза (КОЕ - МГЦЭ), так и клетки, дифференцирующиеся лишь в одном направлении, - клетка-предшественница гранулоцитов (КОЕ - Г), клетка-предшественница моноцитопоэза (КОЕ-М), клетка-предшественница эозинофилов (КОЕ - Эо), клетка-предшественница базофилов (КОЕ - Б), клетка-предшественница мегакариоцитов (КОЕ - МГЦ). Что касается лимфопоэза, то еще не получено подтверждения существования общей (для Т- и В-лимфоцитов) клетки-предшественницы, и она остается гипотетичной. Однако на основании обнаружения соответствующих клеточных антигенных маркеров выявлены клетки-предшественницы отдельно для Т- и В-лимфоцитов.

Перечисленные выше классы стволовых, полустволовых и унипотентных предшественников имеют лимфоцитоподобный вид и морфологическими методами не распознаются, а определяются по поверхностным антигенам, так как на данных стадиях гемопоэза дифференцировка идет лишь на уровне генома. Если за счет стволовых клеток происходит качественная регуляция кроветворения, то есть снабжение кроветворной системы всеми видами предшественников, то на стадии поэтинчувствительных и следующих за ней морфологически распознаваемых стадиях большинство клеток находится в состоянии пролиферации. Именно в этом отделе реализуется основная количественная регуляция кроветворения, то есть обеспечение необходимого количества клеток нужного типа в ответ на конкретные потребности организма.

Гемопоэтические клетки классов I-III находятся, в основном, в красном костном мозгу. Правда, при этом они могут попадать в кровь и после циркуляции вновь выселяться в кроветворные органы. Это явление называется репопуляцией. Однако, если в какой-то момент клетки классов I-III и оказываются в крови, то содержание их в ней (по сравнению с форменными элементами крови) крайне ничтожно [Воробьев Д.И., 2002].

IV- Бласты – молодые клетки, отличаются по морфологии как от трех предшествующих, так и последующих классов клеток. Эти клетки крупные, имеют крупное рыхлое (эухроматин) ядро с 2-4 ядрышками, цитоплазма базофильная за счет большого числа свободных рибосом. Часто делятся, но дочерние клетки все вступают на путь дальнейшей дифференцировки. По цитохимическим свойствам можно идентифицировать бласты разных рядов кроветворения.

V- Созревающие клетки – многочисленные дифференцирующиеся клетки, последовательно переходящие друг в друга, морфологически хорошо различимые. Дифференцировка клеток пятого класса в процессе миелопоэза выражается появлением ряда морфологических особенностей.

VI- Зрелые клетки – дифференцированные форменные элементы крови. Однако следует отметить, что только эритроциты, тромбоциты и сегментоядерные гранулоциты являются зрелыми конечными дифференцированными клетками или их фрагментами. Моноциты не окончательно дифференцированные клетки. Покидая кровеносное русло, они дифференцируются в конечные клетки - макрофаги. Лимфоциты при встрече с антигенами, превращаются в бласты и снова делятся (антигензависимая бласттрансформация).

Особенностью современной схемы кроветворения является признание существования двух видов дендритных клеток (отростчатые клетки, обеспечивающие презентацию антигена для формирования иммунного ответа) лимфоидного и миелоидного (моноцитарного) происхождения. Источником свободных и фиксированных макрофагов тканей (например, клеток Лангерганса кожи, купферовских клеток печени, клеток микроглии головного мозга) являются производные моноцитов, мигрировавших в ткани, а следовательно, происходят они из костного мозга [Владимирская Е.Б., 2015].

Конечные стадии дифференциации и созревания клеток всех клеточных линий преодолевают костномозговой барьер и поступают в кровеносное русло. Вместе с жидкой частью (плазмой) клетки, именуемые форменными элементами, образуют периферическую кровь. Огромный пул циркулирующих и функционирующих в тканях кровяных клеток представляет собою чрезвычайно гетерогенный состав. Это объясняется очень тонкой дальнейшей специализацией клеток и нахождением их в различных зонах распределения и влияния [Чеснокова Н.П. и соавтр., 2012].

Клетки крови представляют собой разнородную цитологическую систему, состоящую из элементов, различающихся как в функциональном и морфологическом, так и в кинетическом отношении; но их объединяет общность гистогенеза; совместная циркуляция в периферической крови, участие в транспорте веществ и в выполнении защитных и регуляторных функций.

Нормальное кроветворение – сбалансированная клеточная система со сложной регуляцией постоянства количественного и качественного состава отдельных ее звеньев. Закономерности жизненного цикла отдельных клеточных поколений, переход клеток из одного цитологически однородного пула в другой, из костного мозга в кровь, из крови в ткань, резервация клеток, регуляция их рождения, движения по жизненному пути, старение и разрушение – составляет сущность процессов клеточной кинетики.

1.4. Эритропоэз

Эритропоэз представляет собой постоянный и непрерывный процесс образования и восстановления клеток эритрона, главной функцией которых является снабжение тканей кислородом, поэтому любое ее нарушение влечет за собой тяжелые последствия для всего организма [Baumann R., Dragon S., 2005; Barminko J. et al., 2016; Shi H. et al., 2016]. При

изменении условий жизнедеятельности организма человека величина костномозговой продукции эритроцитов увеличивается или уменьшается в зависимости от потребностей организма [Бондарь Т.П. и соавтр., 2007; Liu J. et al., 2015].

Клеточная основа эритропоэза состоит из дифференциации, пролиферации и созревания эритроидных предшественников в костном мозге с последующим выходом эритроцитов в циркуляцию крови. При этом дифференцировка выступает не только как следствие дерепрессии соответствующих генов стволовых клеток, но и как процесс сцепленный с серией последовательных митозов, в результате чего из клеток-предшественников в костном мозге формируется эритроидная популяция, клетки которой хорошо различимы морфологически, биохимически и функционально. Поэтому, эта модель предоставляет редкую возможность для наблюдения как за динамикой морфологической дифференцировки клеток, так и за накоплением в них тканеспецифического белка – гемоглобина на каждом из этапов их дифференцировки и специализации. Последний обладает уникальными свойствами, которые обеспечивают быстрое поглощение O_2 из альвеолярного воздуха и его транспорт в клетки и ткани организма. Несмотря на то, что на протяжении десятилетий эритроидная система привлекала к себе внимание гематологов, цитологов, гистологов и эмбриологов, а в последнее время и молекулярных биологов, многие стороны процесса развития эритроидных клеток и его регуляция в норме и патологии остаются невыясненными. Одной из причин, обуславливающих это в эволюционном плане, является чрезвычайная пластичность эритропоэза, проявляющаяся с одной стороны в ее особенностях у различных классов позвоночных, а с другой стороны, в особенностях эритропоэза, присущих определенному типу индивидуального развития [Kato T. et al., 2016]. Таким образом, являясь типичным примером терминальной дифференцировки, эритропоэз, учитывая его лабильность, позволяет в условиях естественного эксперимента рассмотреть взаимоотношения между основными процессами специализации клетки. С помощью внешних воздействий можно влиять на темп образования эритроцитов, последовательность стадий и на характер морфологических изменений при эритропоэзе [Каралова Е.М., 2012].

В процессе эритропоэза клетки проходят три стадии развития: стволовые кроветворные клетки, эритроидные клетки-предшественники (ЭКП) и созревающий эритрон [Wataru N. et al., 2015]. Родоначальница эритроидных клеток крови плюрипотентная СКК, способная формировать колонии в культуре костного мозга дает два типа мультипотентных частично коммитированных клеток: 1) коммитированные к лимфоидному типу дифференцировки; 2) КОЕ-ГЭММ-единицы, образующие смешанные колонии, состоящие из гранулоцитов, эритроцитов, моноцитов и мегакариоцитов (аналог КОЕ-С *in vitro*). Из

второго типа мультипотентных стволовых кроветворных клеток дифференцируются унипотентные единицы: бурстобразующая (БОЕ-Э) и колониобразующая (КОЕ-Э) эритроидные клетки, которые являются коммитированными родоначальными клетками эритропоэза [Engkand S.J., 2010].

Первым эритроидным предшественником является бурстобразующие единицы эритроцитарные (burst–англ.–взрыв, взрывообразующая). По сравнению с колониобразующей единицей эритроцитарной (КОЕ-Э) – менее дифференцирована [Palis J., 2014]. При культивировании кроветворных клеток в плазменном геле, в присутствии высоких концентраций эритропоэтина (порядка 3-10 Ед/мл) образуются колонии клеток. Число колоний, состоящих из сотен клеток, растет линейно с увеличением количества клеток, что подтверждает клональную природу колоний и их возникновение из одной клетки – БОЕ-Э. В течение 10 суток она осуществляет 12 делений и образует колонию из 5000 эритроидных клеток с незрелым фетальным гемоглобином [Липунова Е.А., Скоркина М.Ю., 2007].

БОЕ-Э малочувствительна к эритропоэтину и вступает в фазу размножения под влиянием интерлейкина-3 (бурстпроторная активность), вырабатываемого моноцитами – макрофагами и Т-лимфоцитами. Интерлейкин-3 – гликопротеин с молекулярной массой 20-30 кД. Он активирует ранние полипотентные стволовые кроветворные клетки, обеспечивая их самоподдержание, а также запускает дифференцировку полипотентных клеток в коммитированные. Интерлейкин-3 способствует образованию эритроцитарных колониобразующих единиц (КОЕ-Э), чувствительных к эритропоэтину.

Отдел БОЕ-Э неоднороден и включает несколько стадий дифференцировки. Более зрелые БОЕ-Э отличаются большей чувствительностью к эритропоэтину, образуя бурсты меньшей величины [Филоненко Е.С. и соавтр., 2013]. Самые ранние БОЕ-Э продуцируют огромные бурсты, состоящие из 16 дочерних колоний, обладают некоторой чувствительностью к колониестимулирующей активности, вызывающих образование гранулоцитарно-макрофагальных колоний. Этот (первый) ряд эритроидной дифференцировки не утратил способности и к гранулоцитарной дифференцировке [Tober J. et al., 2007]. Более зрелые БОЕ-Э отличаются большей чувствительностью к эритропоэтину, образуя бурсты меньшей величины (рис. 4). Они способны в плазменных культурах за 2 дня пролиферации, в присутствии относительно низких концентраций эритропоэтина (0,25 Ед/мл), образовывать колонию из 4-32 эритроидных элементов [Malik J. et al., 2013].

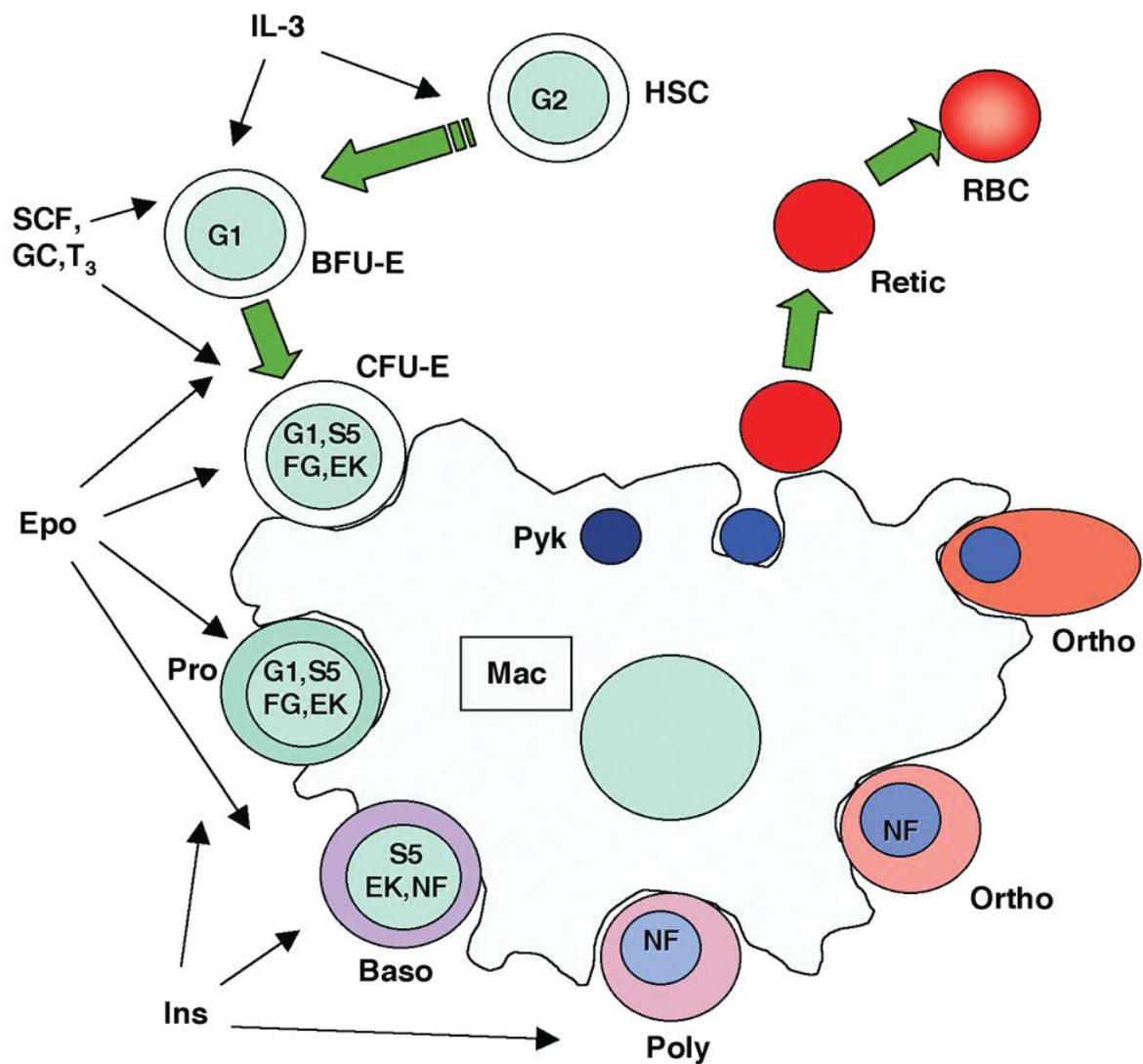


Рисунок 4. Регуляция эритропоэза [Ingleby E. et al. , 2004].

- HSC- гемопоэтические стволовые клетки*
- RBC- эритроциты*
- BFU-E –бурстобразующие единицы*
- CFU-E – колониобразующие единицы*
- Pro - проэритробласт*
- Baso – базофильный эритробласт*
- Poly – полихроматофильный эритробласт*
- Ortho- ортохромный эритробласт*
- Retic - ретикулоцит*
- IL-3 – интерлейкин -3*
- SCF – фактор стволовых клеток*
- GC - глюкокортикоиды*
- T₃ - тиреоидный гормон*
- Epo - эритропоэтин*
- Ins - инсулин*
- Pyk – фагоцитированные пикнотические ядра*

Эритроцитарная колониобразующая единица более зрелая, высокочувствительная к эритропоэтину клетка (без гормона она не образуется), формирующаяся из пролиферирующей эритроцитарной бурстобразующей единицы. Под влиянием эритропоэтина эритроцитарная колониобразующая единица формирует колонии, состоящие примерно из 60 эритроцитарных элементов. Количество эритроидных клеток, образуемых в сутки из КОЕ-Э, в 5 раз меньше количества аналогичных клеток, образуемых из эритроцитарной бурстобразующей единицы [Чеснокова Н.П. соавтр., 2015]. Таким образом, эритроцитарные бурстобразующие единицы наиболее примитивные предшественники эритроцитов, которые способны генерировать тысячи эритроидных предшественников. Они содержатся в малом количестве в костном мозге и крови благодаря лишь частичному самоподдержанию и миграции из компартмента мультипотентных стволовых кроветворных клеток [Lu S.J. et al., 2008]. Под влиянием эритропоэтина эритроцитарная колониобразующая единица дифференцируется в морфологически распознаваемые клетки эритроцитарного ряда: проэритробласты, эритробласты, нормоциты, ретикулоциты и эритроциты [Ingleby E. et al., 2004; Kawabata H. et al., 2016].

Проэритробласты – первые морфологически опознаваемые предшественники эритроцитов, диаметром 14–19мкм, с многочисленными органеллами, не содержат гемоглобин. Ядро расположено центрально, сохраняет нежную сетчатую структуру. Объем цитоплазмы составляет около 20% общего объема клетки, присутствие значительного количества полирибосом обуславливает базофилию клетки. Клетки подвергаются многократным митозам [Dzierzak E., Philipsen S., 2013].

Эритробласт – родоначальная клетка эритроцитарного ростка. Ядро нежной структуры, округлое, расположено центрально, занимает большую часть клетки, красно-фиолетового цвета, содержит от 1 до 5 ядрышек. Цитоплазма насыщенного синего цвета, зернистости не содержит. Вокруг ядра заметна зона просветления. На дальнейших этапах дифференцировки происходят уменьшение размера клетки, конденсация хроматина и уменьшение диаметра ядра, прогрессирующая потеря органелл и рибонуклеиновой кислоты (РНК), постепенное увеличение содержания гемоглобина; элиминация ядра [McGrath K.E. et al., 2008]. Образование эритробластов происходит только в присутствии достаточной концентрации эндогенного эритропоэтина, в противном случае клетки подвергаются гибели

– апоптозу [McIver S.C. et al., 2016].

Несомненно, что эритробласты можно относить к иммунорегуляторным клеткам, оказывающим иммуносупрессивный эффект в отношении пролиферации В-лимфоцитов прежде всего. Показано, что эритробласты экспрессируют целый ряд важнейших иммунорегуляторных цитокинов. При этом интенсивность экспрессии непосредственно связана с возрастом организма и с отдельными патологическими состояниями. Необходимо добавить, что эритробласты обладают цитостатическим эффектом, что позволяет им тормозить рост ряда опухолевых клеток. По существу, в этом у них проявляется функция иммунного надзора. Несомненно, здесь следует упомянуть об иммунорегуляторной функции не только клеток эритроидного ряда, но и их гормона эритропоэтина, который может усиливать иммунонаправленные функции самих эритробластов, так же как и действовать непосредственно на иммунокомпетентные клетки [Козлов В.А., 2005].

Последовательно различают эритробласты базофильные, полихроматофильные, оксифильные нормобласты (нормоциты) в зависимости от степени насыщения их цитоплазмы гемоглобином:

– базофильный эритробласт, диаметр 13-16 мкм, содержит ядро с более плотным хроматином. Цитоплазма более базофильна, около ядра часто виден клеточный центр. Клетка сохраняет способность к митозу и активно синтезирует гемоглобин;

– полихроматофильный эритробласт, диаметр 12-15 мкм, содержит значительное количество гемоглобина. Серовато-фиолетовый тон цитоплазмы обусловлен базофильным окрашиванием рибосом и оксифильным – гемоглобина. Размеры ядра уменьшаются, клетки сохраняют способность к митозу и продолжают синтезировать гемоглобин.

– оксифильный эритробласт (нормобласт), диаметр 8-10 мкм, цитоплазма оксифильная со следами базофилии. Такая окраска обусловлена значительной концентрацией гемоглобина и присутствием рибосом. Ядро небольшое, пикнотическое, содержит конденсированный хроматин. Ранние нормобласты могут делиться, в целом же на этой стадии эритроидные клетки постепенно утрачивают способность к делению и выталкивают ядро. Нормоцит вызревает в эритроцит через стадию ретикулоцита- молодого предшественника эритроцита, сохранившего остатки базофильной субстанции (РНК) цитоплазмы [Соболева Т.Н., Владимирская Е.Б., 2003].

Ретикулоцит – незрелый эритроцит, поступающий в кровотоки из костного мозга, диаметр – 9-11 мкм, неправильной формы, что связано с ее подвижностью. Ретикулоцит содержит рибосомы, митохондрии, комплекс Гольджи. Инволюция органелл происходит по мере созревания клетки. Морфологическая особенность ретикулоцита – присутствие нитчато-сетчатой субстанции ретикуло-филаментозной природы, содержащей РНК. В ретикулоцитах некоторое время продолжается синтез гемоглобина. Количество поступающих в кровь ретикулоцитов равно количеству поврежденных эритроцитов, гибнущих в печени, селезенке, костном мозге. Ретикулоциты составляют около 1 % всех циркулирующих эритроцитов.

Превращаясь в эритроциты за 1 – 2,5 дня, ретикулоциты содержат то количество гемоглобина, которое синтезировалось в них за последние 60 часов. Таким образом, содержание гемоглобина в ретикулоцитах адекватно отражает состояние эритропоэза, практически в "режиме реального времени". Подсчет ретикулоцитов и определение времени их созревания в кровотоке служит надежным методом выявления суточной продукции эритроцитов, продолжительности их жизни, а следовательно, и эффективности костномозгового кроветворения [Барановская И.Б., Онишук С.А., 2008; Павлова Т.В. и соавт., 2014].

В современных схемах кроветворения ретикулоцит занимает особое положение. Одни исследователи приводят доказательства в пользу искусственного характера включения ретикулоцита в схему эритропоэза, указывая на то, что определенная часть ретикулоцитов окрашивается по Романовскому – Гимза как полихроматофилы; другие – рассматривают ретикулоциты как оксифильные эритроциты и считают неправомерным помещением ретикулоцита в схему эритропоэза после оксифильного эритробласта [Nandakumar S.K. et al., 2016].

Несмотря на дискуссии относительно местоположения ретикулоцита в схеме гемопоэза, нельзя отрицать диагностическое значение этой генерации клеток в определении функциональной активности костного мозга при оценке эритроцитарного баланса в условиях физиологической и репаративной регенерации системы крови.

Эритроцит – зрелая клетка периферической крови диаметром 7 – 8 мкм, имеет форму двояковогнутого диска, оксифильную цитоплазму, насыщенную гемоглобином. Период образования эритроцита от эритробласта до зрелой клетки занимает 7 суток. В

физиологических условиях эритроциты человека находятся в кровообращении около 120 суток [Боровская М.К. и соавтр., 2010].

На первой фазе ретикулоциты не несут полную нагрузку гемоглобина, созревание завершается за 1-3 сут. В периферической крови, в течении которых клетка выполняет функцию транспорта кислорода. На второй фазе, зрелого (функционального) эритроцита, клетка полностью выполняет газотранспортную функцию; на третьей фазе, дефицитного (не полноценного) эритроцита с уменьшенной эффективностью, утраченной гибкостью и сниженным метаболизмом, вследствие изнашиваемости ферментов без какой-либо возможности замены, эритроцит стареет [Кривенцев Ю.А. и соавтр., 2007]. Жизненный цикл эритроцита в кровотоке в среднем составляет 100-120 дней. Лишенные способности переносить кислород красные клетки крови теряют свою функциональную ценность. На этой стадии они легко распознаются макрофагами, устраняются из кровообращения, тем самым, открывая путь молодым клеткам, вступающим в функциональный цикл [Трошкина Н.А. и соавтр., 2007].

Поступление эритроцитов в кровоток осуществляется активными движениями, наподобие процесса диапедеза лейкоцитов и таким образом клетки проходят среди расщелин, образованных фибробластами и эндотелиальными клетками в синусы, откуда поступают в венозную кровь. Полагают, что выталкивание эритроцитов из костного мозга происходит в порядке собственной непрерывной клеточной пролиферации. Выявленные способности ретикулоцитов самостоятельно передвигаться подтвердило наличие диапедеза и у молодых эритроцитов [Liang R., Ghaffari S., 2016].

Процесс диапедеза начинается отделением оксифильного эритробласта эритробластического островка, за которым следует выталкивание ядра и переход в кровеносную систему. Изгнание ядра может осуществляться одновременно с диапедезом. Как только нормороцит достигает стадии ретикулоцита, он растягивает стенку капилляра, благодаря чему сосуд раскрывается и ретикулоцит вымывается в кровоток, где и превращается за 35-45 ч в молодой эритроцит. Ретикулоцит, который не прошел барьер, образованный стенкой сосудистого эндотелия, созревает в паренхиме, утрачивает способность диапедеза, остается заблокированным и фагоцитируется макрофагами. Эти эритроциты входят в состав неэффективного эритропоэза [Dulmovits B.M. et al., 2017].

Более молодые ретикулоциты способны синтезировать гемоглобин, липиды, пурины, в них происходит фосфорилирование, сопряженное с окислением, и гликолиз. Синтез РНК в ретикулоцитах не происходит. Созревание ретикулоцитов сопровождается исчезновением полирибосом и экзоцитозом митохондрий. На конечной стадии ретикулоцит теряет способность синтезировать гемоглобин. Ретикулоцит имеет на поверхности такие же молекулы, как зрелый эритроцит, включая гликофорин А, антигены группы крови и резус-антигены. Ретикулоцит поглощает молекулы железа благодаря рецепторам к трансферрину, которые имеются на мембране молодых ретикулоцитов. По мере созревания в ретикулоцитах снижается содержание РНК, изменяется структура мембраны, что морфологически отражается снижением объема и диаметра клетки, поэтому средний объем ретикулоцитов на 24-35% больше среднего объема эритроцитов [Морщакова Е.Ф. и соавтр., 1999].

Количество ретикулоцитов отражают скорость продукции эритроцитов в костном мозге. Их подсчет имеет значение для оценки степени активности эритропоэза. При расширении эритроидного ростка кроветворения в костном мозге, наличии анемии и отсутствии ретикулоцитоза в периферической крови можно констатировать выраженный неэффективный эритропоэз [Долгов В.В. и соавтр., 2001].

Изучение состояния эритроцитов при критических, терминальных и постренимационных состояниях позволяет выявить, как реагируют клетки, ответственные в первую очередь за газообмен в организме, на сильные изменения обмена веществ, происходящие при критических состояниях, и как при этом изменяются их функциональные, структурные и биохимические свойства. Изменения морфофункциональных свойств эритроцитов приводят к нарушению газообмена, изменению рН крови, изменяется метаболизм, поскольку эритроциты являются переносчиками некоторых ферментов [Kabalin A.E. et al., 2008; Zhang H. et al., 2016]. Поэтому восстановление или сохранение популяции функциональных эритроцитов может решить не только проблемы, связанные с газообменом, но и восстановить метаболизм, нарушенный при критических состояниях. Необходимы дальнейшие исследования состояния эритроцитов при критических состояниях для поиска способов коррекции морфологических, функциональных и ультраструктурных изменений эритроцитов [Мороз В.В. и соавтр., 2012].

Современная модель эритрона, представляющая совокупность клеточных элементов, развивающихся по пути эритроидного ряда, – от плюрипотентной стволовой клетки до зрелого эритроцита предусматривает возможность генерации трех популяций эритроцитов: нормальный тип деления клеток (80–85%), терминальный (19–15%) и неэффективный (3–8%). У человека в норме в костном мозге преобладает так называемая «нормальная» популяция ядерных и безъядерных клеточных форм эритропоэза [Gnanapragasam M.N., Bieker J.J., 2017].

Терминальный тип деления характеризуется тем, что клетка в процессе своего созревания в костном мозге проходит минимальное количество делений, обычно 1-2, минуя деление на стадии полихроматофильного или ортохромного (оксифильного) эритробласта, и выходит в кровяное русло в виде одного или двух эритроцитов-макроцитов, что приводит к сокращению объема продукции эритроцитов минимум в два раза.

Неэффективный эритропоэз отражает деструкцию эритроидного ростка костного мозга. Такие деструктивные клетки разрушаются в костном мозге на разных стадиях созревания – от ранних коммитированных предшественников эритропоэза до нормобласта; основная причина их гибели – нарушение внутриклеточного метаболизма. Состояние «неэффективного эритропоэза» объединяет кроме внутрикостномозгового разрушения ядродержащих эритроидных предшественников также продукцию функционально неполноценных эритроцитов. Неэффективный эритропоэз в норме является одним из физиологически обусловленных механизмов регуляции равновесия в системе эритрона в условиях постоянно изменяющихся потребностей организма в продукции эритроцитов [Tumburu L., Thein S.L., 2017].

Постэмбриональный эритропоэз у млекопитающих происходит в структурно-функциональных образованиях гемопоэтической ткани – эритробластических островках (ЭО).

Эритробластические островки в костном мозге описаны у многих видов млекопитающих: в костном мозге человека, в костном мозге взрослых крыс, в костном мозге и печени эмбрионов свиней, в костном мозге кроликов [Шахов В.П. и соавтр., 2004; Матюшичев В.Б., Шамратова В.Г., 2005; Мамылина Н.В., 2009; Kusakabe M. et al., 2011; Овсянникова О.А. и соавтр., 2012; Захаров Ю.М., Камиллов Ф.Х., 2014; Татоян М.Р., 2016].

Эритропоэз у человека и млекопитающих протекает в эритробластических островках,

формирующихся после комплексации колониеобразующих эритроцитарных единиц (или проэритробластов) с макрофагами костного мозга, где макрофаг (гистиоцит) окружен эритроидными клетками разной степени зрелости (рис. 3.) [McGrath K.E. et al., 2015]. Занимающая центральное положение клетка в эритробластическом островке может быть представлена также монобластом или моноцитом, являющимся предшественником клеток макрофагального ряда [Chasis J.A., Mohandas N., 2008]. Последовательные удвоения исходной клетки (КОЕэ или проэритробласта) 1:2:4:8:16:32 создают эритроидную «корону» эритробластического островка.

"Корона" макрофага эритробластического островка представлена одним или несколькими слоями эритроидных клеток, причем морфологические исследования показали, что эритробласты находятся в центральных областях эритробластического островка, а более дифференцированные эритроидные клетки - на периферии [Захаров Ю.М. и соавтр, 2015; Belay E. et al., 2017].

По числу ядросодержащих эритроидных клеток эритробластические островки подразделяются на три класса. Первый класс включает до восьми клеток, второй – от девяти до шестнадцати и третий класс – более семнадцати клеток. В костном мозге крысы эритробластические островки первого класса составляют 54,5%, второго – 38% и третьего – 7,5%. Установлено, что эритропоз в костном мозге крысы протекает на всем пространстве костномозговой ткани и не ограничивается, как предполагалось ранее, территорией, прилегающей к синусоидам [Крестянинова О.Г., 1994].

Цитоплазматические отростки макрофагов всегда имеют тесный контакт с эритробластами, причем эритробласты ранних стадий развития более плотно сгруппированы. По мере созревания они начинают отделяться от центра островка. Способность зрелых эритробластов к дисперсии в ткани костного мозга позволила предположить изменения свойств поверхности их мембран при созревании [Palis J., 2017].

По мере дифференцировки эритроидная клетка мигрирует к концу отростка макрофага, а следом за ней перемещаются менее дифференцированные клетки. Затем эритробласт вступает в контакт с эндотелием ближайшего синуса, проходит через его стенку и попадает в общий кровоток. Ядро при этом выталкивается и фагоцитируется макрофагами. [Yokoyama T. et al., 2003].

Необходимо отметить, что моноциты-макрофаги костного мозга, являясь центральной клеткой эритробластического островка, обладают высоким аффинитетом по отношению к эритроидным клеткам, регулируют их пролиферацию и дифференцировку, создают специфическое гемопоэтическое микроокружение, продуцируют биологически активные гуморальные факторы, обеспечивая адаптивные реакции кроветворной ткани при экстремальных воздействиях [Chasis J.A., 2006; Юшков Б.Г. и соавтр., 2010].

Однако многие вопросы, касающиеся роли макрофагов в регуляции функциональной активности гемопоэтических клеток при воздействии на организм экстремальных факторов, расшифровка конкретных механизмов эритропоэза, протекающих с участием моноцитов-макрофагов костного мозга, а также изучение взаимосвязи макрофагальных механизмов регуляции эритропоэза с другими регуляторными системами являются актуальной научной проблемой и требуют специальных целенаправленных исследований [Улитко М.В., 2008]

Для анализа кинетики формирования эритробластических островков и протекающего в них эритропоэза, Захаровым Ю.М. (2015) была разработана формула эритробластических островков, основанная на представлении о последовательных удвоениях эритроидных клеток, начиная с проэритробласта, после дифференциации в него эритроцитарной колониеобразующей единицы.

Первый класс зрелости эритробластических островков - клетки эритробластического островка представлены проэритробластами, эритробластами или базофильными нормобластами, число клеток, способных к делению, менее или равно 8; оно отражает последовательность удвоения клеток: 1 : 2 : 4 : 8.

Второй класс зрелости эритробластических островков - клетки эритробластического островка представлены базофильными или ранними полихроматофильными нормобластами, число ядросодержащих клеток, способных к делению, составляет от 9 до 16, и является следствием удвоения 8 : 16.

Третий класс зрелости эритробластических островков - клетки эритробластического островка представлены средними полихроматофильными нормобластами и неспособными к делению поздними полихроматофильными нормобластами и оксифильными нормобластами (нормоцитами), а также ретикулоцитами, число ядросодержащих клеток более 16, и является следствием удвоения 16 : 32.

Инволюцирующие эритробластические островки - клетки эритробластического островка представлены поздними полихроматофильными и оксифильными нормобластами (нормоцитами), а также ретикулоцитами, число ядродержащих клеток менее 16.

Реконструирующиеся эритробластические островки - это островки, эритроидные клетки которых находятся на разных стадиях дифференцировки, и выглядят как присоединение к инволюцирующему островку молодых эритроидных клеток, то есть появление в инволюцирующем эритробластическом островке наряду с неделящимися полихроматофильными, оксифильными нормобластами (нормоцитами) и ретикулоцитами проэритробластов и/или базофильных нормобластов [Manwani D., Bieker J.J., 2008].

В физиологических условиях в «короне» островков совершается не более пяти удвоений эритроидных клеток, формирующих до 32 оксифильных нормобластов и, следовательно, до 32 ретикулоцитов. Реконструкция эритропоза, т. е. дифференциация КОЕэ или проэритробласта в «короне» инволюцирующих островков сопряжена с высвобождением из нее ретикулоцитов.

Стимуляция эритропоза (вызываемая в эксперименте острой кровопотерей, гипобарической гипоксией, инъекцией эритропэтина и т.д.) закономерно приводит к увеличению содержания островков в единице объема кроветворной ткани, в ней возрастает число эритробластических островков I класса зрелости (т. е. число дифференцирующихся КОЕэ или проэритробластов после клеточно-клеточного контакта с резидуальными макрофагами костного мозга) и число реконструирующихся эритробластических островков (т. е. число макрофагов инволюцирующих островков повторно вовлекаемых в поддержку эритропоза после дифференциации в их «короне» КОЕэ или проэритробласта). Одновременно снимается «запрет» на дифференциацию КОЕэ (проэритробластов) в «короне» эритробластических островков III класса зрелости. Возможность реконструкции эритропоза в островках III класса возникает, вероятно, в связи с ускоренным высвобождением ретикулоцитов из их «короны» и отражает ускорение как пролиферации, так и созревания эритроидных клеток в островках. Количество островков I, II и III классов в кроветворной ткани нарастает синхронно, т. е. темп удвоений эритробластов, начавшийся в островках I класса, сохраняется в эритробластических островках II и III классов. При компенсационном эритропозе в кроветворной ткани обнаруживаются эритробластические островки,

формирующие свыше 32 оксифильных нормобластов, что указывает на возможность не менее шести последовательных удвоений эритроидных клеток в «короне» островка при возбужденном эритропоэзе и объясняет появление подобных «супер-эритробластических островков». В результате включения перечисленных функциональных резервов воспроизводство эритроцитов в островках резко увеличивается.

Напротив, торможение эритропоэза характеризуется резким уменьшением количества эритробластических островков в кроветворной ткани как за счет торможением их формирования *de novo* (уменьшается число островков I класса зрелости), так и замедленного повторного вовлечения в реконструкцию эритропоэза макрофагов инволюцирующих островков, т.е. снижается число реконструирующихся островков. Замедление созревания эритроидных клеток в «короне» островков приводит к накоплению в кроветворной ткани их зрелых форм - инволюцирующих эритробластических островков, однако, воспроизводство ретикулоцитов этими островками оказывается заторможенным.

Таким образом, по сравнению с общеизвестными приемами исследования эритропоэза (парциальная эритрограмма костного мозга, лейкоэритроцитарный коэффициент, абсолютное и относительное количество ретикулоцитов в крови) оценка формирования и состава по классам зрелости эритробластических островков в кроветворной ткани костного мозга раскрывает ранее не учитывающиеся стороны морфофункциональной организации эритропоэза, особенности его кинетики в эритробластических островках [Стрижиков В.К. и соавтр., 2014].

Центральные макрофаги островков, поддерживающие эритропоэз в костном мозге, принадлежат к субпопуляции его моноцитов–макрофагов, которые экспрессируют адгезивные молекулы (рецепторы), обеспечивающие клеточно–клеточные взаимодействия между макрофагом и КОЕэ, а также эритроидными клетками; активируют функцию лизосомальных ферментов и осуществляют фагоцитоз ядер нормобластов и поврежденных эритроидных клеток; осуществляют секрецию протеолитических ферментов, участвующих в отсоединении ретикулоцитов от связи с макрофагом островка. Эффекты, стимулирующие пролиферацию и созревание эритроидной «короны» обеспечиваются экспрессией в центральных макрофагах островков гена эритропоэтина, последующей его секрецией, а также сульфатированных и сверхсульфатированных глюкозаминогликанов в слой жидкости

межклеточной щели, отделяющей макрофаг от эритробластов. Глюкозаминогликаны создают высокую концентрацию цитокинов, в том числе эритропоэтина, и других ростковых соединений в непосредственной близости мембраны эритроидной клетки, создавая условия для лучшего взаимодействия этих соединений с их рецепторами на эритроидных клетках [Захаров Ю.М. и соавт., 2015]. Основным фактором, запускающим вышеперечисленные эритропоэтические функции центрального макрофага островка, является эритропоэтин. Центральный макрофаг эритробластического островка подвержен также регулирующим эффектам цитокинов и лимфоцитов, взаимодействие эритробластических островков, с которыми значительно меняется при разных функциональных состояниях эритрона. Однако, основным фактором, определяющим выраженность эритропоэтической функции эритробластического островка, является воздействие на его компоненты эритропоэтина. Другие гуморальные регуляторы лишь модулируют эффекты эритропоэтина на формирование островков и течение в них эритропоэза. Торможение эритропоэза сопровождается угнетением функциональной активности центрального макрофага островка - снижается его способность к воспроизводству глюкозаминогликанов, фагоцитарная и другие функции.

Производство эритроцитов, то есть интенсивность процессов эритропоэза, регулируется петлей отрицательной обратной связи при участии гормона эритропоэтина. Эта система саморегулируется таким образом, чтобы в нормальном, здоровом состоянии организма скорость производства костным мозгом новых эритроцитов приблизительно соответствовала скорости разрушения «пожилых» (уже деформировавшихся от старости и потому захваченных и разрушенных клетками ретикулоэндотелиальной системы и в частности макрофагами селезёнки), то есть чтобы уровень гемоглобина и эритроцитов в крови оставался приблизительно постоянным. А уровень этот поддерживается таким, чтобы количество гемоглобина и эритроцитов было достаточным для обеспечения адекватного снабжения тканей (и в частности печени и почек) кислородом, но при этом чтобы это количество эритроцитов также не было чрезмерным, вызывающим чрезмерное «сгущение крови», повышение её вязкости, агглютинацию («склеивание») эритроцитов в кровяном русле, чрезмерное увеличение объёма крови и повышение артериального давления, развитие тромбозов, инфарктов или инсультов.

Эритропоэтин выделяется в печени и почках в ответ на пониженное содержание в их

тканях кислорода, то есть на ухудшение кислородного снабжения ткани печени или почек, чем бы оно ни было вызвано — анемией, спазмом сосудов почек или печени, недостаточным содержанием кислорода в воздухе, заболеванием лёгких или сердца, сосудов [David R.B. et al., 2002]. Поэтому, полицитемия является естественным физиологическим ответом на заболевания легких, снижение содержания кислорода в атмосфере (высокогорная полицитемия) и др. Кроме того, циркулирующий в крови эритропоэтин связывается циркулирующими эритроцитами, поэтому низкое содержание эритроцитов в крови приводит к повышению количества свободного (не связанного с эритроцитами) эритропоэтина, что приводит к стимуляции производства эритроцитов костным мозгом и к повышению их содержания в крови. Вследствие этого кислородное снабжение печени и почек улучшается (так как эритроцитов и гемоглобина в крови стало больше), снижается продукция ими эритропоэтина, а уровень свободного (несвязанного) эритропоэтина снижается из-за связывания увеличившимся количеством эритроцитов [Alam M.Z. et al., 2017].

Таким образом, система предотвращает чрезмерное нарастание количества эритроцитов в ответ на стимуляцию и негативные последствия этого чрезмерного нарастания, и самобалансируется.

В процессе образования эритропоэтина выделяют две фазы: программную и синтетическую. В первой фазе клетки почек воспринимают эритропоэтический стимул и «определяют» уровень продукции эритропоэтина; во второй – синтезируют гормон или его предшественника; в этот период клетки уже не способны воспринимать новые стимулы и изменять уровень продукции, запрограммированный в первой фазе [Halvosen S., Bechensteen A.G., 2002]. У нефрэктамированных животных не установлено полного прекращения в организме синтеза эритропоэтина, поскольку в экстраренальном образовании гормона участвуют также печень, селезенка и подчелюстные слюнные железы; наиболее изучена роль печени в этих процессах. Методом культивирования тканей печени, полученных от плодов мышей, в течение месяца в среде, содержащей 20% лошадиной сыворотки, были получены доказательства участия печени в продукции эритропоэтина. Эритропоэтин, выявленный в культуральной среде, терял активность после добавления в среду антисыворотки. Биологическую эффективность вновь образовавшегося гормона оценивали по его влиянию на включение радиоактивного железа в эритроциты полицитемичных мышей и на рост

эритроидных колоний в селезенке облученных мышей. Известно, что в эмбриональном периоде печень и селезенка млекопитающих обладают кроветворной функцией, поэтому закономерно участие этих органов в продукции эритропоэтина (в определенных условиях).

Важное значение в экстраренальном образовании эритропоэтина имеют также подчелюстные слюнные железы. Их удаление, денервация или перерезка протоков снижают (у крыс) экстраренальную продукцию эритропоэтина в ответ на стимулирующие воздействия (гипоксия, кровопотеря). Вероятно, одна из причин ингибиции синтеза эритропоэтина в этих опытах – снижение сосудистого тонуса [Медведев М.А. и соавтр., 2007].

Следовательно, в онтогенезе в организме формируется эритропоэтинообразующая система. В эмбриональном периоде печень не только кроветворный, но и эритропоэтинообразующий орган. В постнатальный период печень утрачивает эту функцию и почки становятся основным органом синтеза эритропоэтина.

В исследованиях последних лет показано, что рецепторы эритропоэтина находятся во многих органах и тканях, а эритропоэтин может играть роль в выживании и дифференцировке незритроидных клеток. Эритропоэтин обладает широким спектром активности, особенно в таких органах, как головной мозг, яичники, матка, маточные трубы, яички [Блиндарь В.Н., Зубрихина Г.Н., 2007].

В регуляции эритропоэтинообразующей системы организма принимают участие гормоны. Получено экспериментальное подтверждение участия гормонов гипофиза, щитовидной железы, надпочечников и половых желез в изменении уровня продукции эритропоэтина. При этом большинство гормональных препаратов оказывало на процессы эритропоэтинообразования стимулирующее воздействие, тогда как эстрадиол его тормозил. Андрогены и эстрогены оказывают противоположное влияние на продукцию эритропоэтина в организме, с чем в значительной мере связаны половые различия эритроцитарного состава крови. Имеются данные, что наряду со стимулирующим влиянием на образование эритропоэтина они индуцируют образование эритропоэтинчувствительных клеток из клеток-предшественниц эритропоэза.

Кроме специфических регуляторов эритропоэза есть еще и неспецифические регуляторы, иногда их называют просто веществами, необходимыми для эритропоэза. К таким веществам относятся витамины и прежде всего витамины группы В: витамин В₂ -

катализатор многих окислительных процессов, активатор витамина В₁₂ принимает участие в процессах всасывания железа. Витамин В₆ - это простетическая группа многих ферментов, участвующих в эритропоэзе, катализирует всасывание витамина В₁₂ в кишечнике, принимает участие в синтезе пуриновых, пиридиновых оснований, нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) и аминокислот.

1.5 Использование свиней для экспериментального моделирования.

Эксперименты с использованием лабораторных животных являются одним из ведущих методов познания в современной биологии, медицине, фармакологии и ветеринарии, а перенос полученных данных от животных на человека является наиболее сложным этапом любого экспериментального моделирования. В связи с этим поиск, оценка и выбор адекватного биологического объекта является краеугольным камнем методологии биомедицины.

Под моделью (лат. *modelus* – норма, образец) подразумевается материальный или виртуальный объект, замещающий в процессе изучения объект-оригинал, сохраняя типичные для конкретного исследования черты. Животное-биомодель – лабораторное животное, используемое в эксперименте с целью построения демонстративных или любых других адекватных моделей функционирования человека и животных для последующего описания и анализа изучаемых процессов.

Для того чтобы перенос экспериментальных данных с модели на человека был правомерен, надежен и в принципе допустим, необходимо соблюдение основного условия моделирования, а именно, принципа подобия экспериментальной модели оригиналу, отклик которого на воздействие любого внешнего фактора окружающей среды она должна воспроизвести [Каркищенко Н.Н., 2007].

Известно, что многие успехи современной биологии и медицины были достигнуты, благодаря наличию и использованию лабораторных животных. Наиболее генетически близкими к человеку млекопитающими являются приматы. Однако имеется масса барьеров при их использовании: ограниченное количество животных этого вида; трудности их выведения в неволе; этические проблемы, связанные с убийством обезьян; невозможность обезопасить больного от инфекционных заболеваний. Животным, обладающим недостаю-

щими обезьянам качествами, как ни странно, оказалась свинья. Преимуществами свиньи по сравнению с приматами являются ее широкая распространенность, беспроblemное выращивание и содержание, сходство свиных органов с человеческими по размерам и физиологии. К тому же изъятие свиных донорских органов не вызывает возражений у защитников природы, поскольку свиней все равно выращивают на мясо.

В последние десятилетия в различных странах в качестве крупного биологического экспериментального объекта все активнее используются свиньи, доля которых в экспериментах из года в год неуклонно растет [Миннебаева Л.Р. и соавтр., 2010; Пчельников Д.В., 2010; Сингина Г.Н. и соавтр., 2011; Стрижиков В.К. и соавтр., 2014; Герасимов В.И. и соавтр., 2014; Пудовкин Н.А. и соавтр., 2015].

Такой высокий интерес к этому виду животных можно объяснить только тем, что организмы человека и свиньи по многим внутренним системам очень близки. Например, пищеварительная, сердечно-сосудистая системы, организация зубной системы, строение глаза, морфология и физиология почек свиней идентичны человеческим. Они имеют сходную с человеком реакцию на стресс-факторы, состав крови и цифры артериального давления.

Ведутся различные работы по усовершенствованию этого вида лабораторных животных в Англии, Японии, Германии, США и других странах, где все шире используются карликовые свиньи в качестве биологических моделей. Светлогорские мини-свиньи полностью соответствуют требованиям, предъявляемым к лабораторным животным, и составляют достойную конкуренцию зарубежным породам. Они живут на ограниченной площади, терпимо относятся к собственным сородичам, размножаются в любые сезоны, не нуждаются в каких-то особых условиях содержания, имеют высокую плодовитость и быстрое созревание, уход за ними несложный, а сами животные безопасны для работающих с ними людей [Станкова Н.В., Капанадзе Г.Д., 2012].

Для свиней характерна крепкая конституция, объемистый костяк, относительно развитая мускулатура, прямые, развитые конечности, уравновешенный темперамент и добрый нрав. Эти животные удобны и практичны для проведения различных экспериментов.

Свиньи играют важную роль во многих медико-биологических исследованиях, касающихся сотен заболеваний, а также изучения широкого круга проблем, имеющих

важное селекционно-генетическое значение. Трудно переоценить огромные возможности доклинических испытаний возрастающего потока новых фармакологических препаратов на свиньях, что надежно проделывать на мышах, крысах и других мелких традиционных лабораторных животных часто невозможно, поскольку эти животные, в отличие от свиней, не являются всеядными.

Благодаря одинаковому типу питания и особенностям липидного и углеводного метаболизма, человек и мини-свинья имеют очень сходный метаболический синдром, болеют сходными болезнями, в том числе спонтанным инфарктом и диабетом 2-го типа, которые справедливо назвали чумой 21-го века. Именно эти обстоятельства в значительной мере способствовали широкому использованию мини-свиней в качестве модели для изучения метаболического синдрома [Тихонов В.Н. и соавтр., 2011].

Несбалансированное кормление и неудовлетворительные условия содержания свиноматок приводят к нарушениям обмена веществ, снижению специфических и неспецифических факторов резистентности, развития вторичного иммунодефицита у беременных животных, а также происходят нарушения внутриутробного развития плода, что приводит к недополучению приплода и рождению недоразвитого нежизнеспособного молодняка [Фомина О.А., 2012].

Для снижения негативного воздействия технологического стресса, повышения адаптивной способности организма животных предложен широкий спектр иммуностимулирующих средств, которые повышают активность клеточных факторов защиты организма свиноматок улучшают общую картину крови, а именно улучшается гемопоэз и лейкопоэз, увеличивается процентное содержание нейтрофилов и моноцитов [Смоленцев С.Ю., 2011; Попов В.С. и соавтр., 2014].

Известно, что здоровье животных в значительной степени определяется состоянием общей резистентности и иммунной системы, следствием чего является дисбаланс обменных процессов [Журавель Н.А., Журавель В.В., 2011].

Реакция свиней на неблагоприятные факторы внешней среды различна и зависит, в основном, от чувствительности или резистентности к стрессу. Изучение иммунной реактивности свиноматок с различной стресс-устойчивостью выявило, что у стресс-устойчивых животных показатели фагоцитоза, комплемента, лизоцимной и бактерицидной

активности сыворотки крови достоверно больше, чем у стресс-чувствительных животных. Оценивая показатели фагоцитоза, гуморального и клеточного звеньев иммунной системы свиней, можно отметить, что стресс-устойчивые животные обладают более высоким уровнем иммунной реактивности организма по сравнению со стресс-чувствительными [Гизатуллина Ф.Г., 2005; Мамукаев М.Н. и соавтр., 2011].

Более того, у стресс-устойчивых животных эритропоэз более выражен, чем у стресс-чувствительных, об этом свидетельствует и более высокое достоверное содержание гемоглобина в крови свиноматок. Что указывает на более лучшую дыхательную функцию эритроцитов крови стресс-устойчивых свиноматок [Гизатуллин А.Н., 2008].

В настоящее время исследования в иммунологии животных достигли значительных результатов, однако имеющиеся представления не в полной мере отражают морфологию иммунной системы организма свиней, которая защищает его от генетически чужеродных веществ, сохраняет генетический гомеостаз, обеспечивает функциональную целостность, повышает его устойчивость к неблагоприятным факторам среды [Шубина Т.П., Чопорова Н.В., 2015].

Селезенка выполняет многочисленные и разнообразные функции. Деятельность селезенки состоит в том, что содержащаяся в ней ткань участвует в иммунных реакциях гуморального типа, так как в ней содержатся Т- и В-лимфоциты и плазматические клетки, синтезирующие антитела (иммуноглобулины), обеспечивающие иммунный контроль крови и оказывающихся в ней генетически чужеродных частиц - бактерий и токсинов [Зайцева Е.В., Башина С.И., 2012; Башина С.И., Зайцева Е.В., 2012]. Структурное многообразие селезенки человека и млекопитающих животных, связанное с видовыми особенностями как анатомическими, так и физиологическими, обуславливает преобладание функций, выполняемых этим сложным органом. На основании гистологической и морфометрической оценки функциональных зон селезенки было выделено четыре группы по преобладающим функциям:

1. Первая группа объединяла животных с ярко выраженной депонирующей способностью органа (лошадь, собака, кошка). Из представителей этой категории в экспериментальной медицине чаще всего используются собаки в хирургической практике.

2. В «селезенке защиты» преобладали иммунная и бактерицидная функции

(мышь, крысы). В этих случаях морфологическая оценка селезенки важна для определения общего токсического воздействия на иммунную систему.

3. У некоторых млекопитающих (человек, свинья, крупный рогатый скот) гистоархитектоника селезенки обуславливала как депонирующую, так и защитную функцию в равной степени, что не позволяло ее отнести к той или иной группе – «смешанный вариант».

4. Вместе с тем, виды животных, у которых селезенка морфологически слабо развита и функционально малоактивна (кролик, морская свинка), часто используются в лабораторной практике [Федеровская Н.С. и соавтр., 2012].

При исследовании белой пульпы селезенки свиней в онтогенезе, в связи с диагностикой иммуносупрессивных состояний, было установлено, что с возрастом происходило увеличение площади лимфоидных узелков, а также наблюдается увеличение количества иммунокомпетентных клеток, образующих фолликул. Затем происходила стабилизация количества клеток лимфоидных структур до шестимесячного возраста. Благодаря этим клеточным компонентам селезенки происходит образование комплекса антиген-антитело, и как результат, формирование иммунных реакций. Наибольшее количество клеток в фолликуле наблюдается у годовалых животных, что вызвано активной пролиферацией и дифференцировкой лимфоидных элементов у животных данной возрастной группы. Это формирует высокий уровень и качество иммунного ответа [Андреева С.Д., 2013].

В целом, морфометрические показатели селезенки увеличиваются неравномерно, интенсивно возрастают до трёх месяцев после рождения, что связано с активным участием селезенки в формировании иммунной защиты организма [Антипов А.А., Жаров А.В., 2013; Озерной Е.В., Шевченко Б.П., 2014].

Исследования динамики внутриутробного периода роста плодов разных полов имеет важное значение для понимания индивидуального развития селезенки в отдельности у свинок и хряков, а по особенностям их неравномерного роста массы в плодном периоде можно заранее предположить, как будет развиваться селезенка после рождения [Шевченко Б.П., Озерной Е.В., 2014].

На человеческий и свиной организмы одинаково воздействуют многие биологические и медицинские препараты в том числе наркотические, антиалкогольные и радиоактивные

вещества [Капанадзе Г.Д., 2006; Трухачев В.И. и соавтр., 2010; Кухаренко Н.С. и соавтр., 2011; Овчинников А.А., 2013].

Исследования российских и зарубежных ученых показывают, что включение пробиотиков в систему выращивания молодняка животных снижает заболеваемость желудочно-кишечными болезнями, сокращает продолжительность выращивания, снижает затраты кормов, повышает сохранность животных. Пробиотические препараты содержат различные штаммы микроорганизмов, обладающие антагонистическими свойствами к вредной микрофлоре, способствующие развитию полезной микрофлоры. Пробиотики нормализуют пищеварение, оказывают антитоксическое и противоаллергенное действие, повышают неспецифическую резистентность макроорганизма [Лучкин К.Ю. и соавтр., 2013].

Ксенотрансплантация органов (животное-человек) является актуальнейшей проблемой, и во многих странах мира усиленно проводятся исследования по преодолению порога несовместимости пересаживаемых органов и реакции иммунной системы. Для коррекции функциональной недостаточности различных органов находит применение ксенотрансплантация свиного материала. Исследователи считают свиней потенциальным поставщиком альтернативных органов, так как внутренние органы свиной и человека очень похожи [Лепехова С.А. и соавтр., 2011].

Клеточная трансплантация свиных донорских клеток имеет несколько существенных преимуществ. Во-первых, свиньи являются одомашненными животными, и в настоящее время мы располагаем достаточной информацией о трансмиссии потенциальных заболеваний от свиной человеку. Несмотря на то, что еще недостаточно изучены некоторые инфекционные заболевания, свиньи считаются относительно безопасным источником донорских клеток. Во-вторых, использование свиней в качестве доноров позволяет получать клетки фактически в неограниченном количестве, а также осуществлять строгий контроль за качеством содержания животных и безопасным получением клеточного материала. Следует отметить, что при выделении клеток из тканей человека, полученных из донорских органов или в результате медицинского аборта, достичь подобной степени контроля невозможно [Хрыщанович В.Я. и соавт., 2012].

Главной проблемой при пересадке является то, что человеческая иммунная система отторгает чужеродные органы. Главную роль в процессе отторжения играет ген альфа-1,3-

галактосилтрансфераза, производящий молекулы сахара. При пересадке чужеродного органа в организм, человеческие антитела прикрепляются к молекулам сахара, расположенным на поверхности свиных клеток и убивают этот орган. Если устранить этот ген, процесс отторжения не начнется [Терлоу С.Л., Добринский Дж.Р., 2012].

Первые опыты по пересадке почек трансгенных свиней обезьянам показали обнадеживающие результаты - почки нормально функционировали в организме обезьяны более двух месяцев [Тихонов Б.Н. и соавтр., 2011].

К настоящему времени широкие перспективы ксеногенной клеточной терапии подтверждены целым рядом экспериментальных и клинических исследований [Куртова А.В., Зуева Е.Е., 2006; Лепехова С.А. и соавтр., 2011; Зиновьева Н.А. и соавтр., 2014; Григорьев Е.В. и соавтр., 2014].

Интеграция чужеродных генов в геном животных может вызывать различные изменения на уровне фенотипа, обусловленные дополнительной экспрессией рекомбинантного продукта. Эти изменения могут проявляться на разных уровнях организации индивидуумов (цитологическом, тканевом, организменном) и в определенной степени влиять на функциональное состояние отдельных систем организма. Так, при введении генов, кодирующих белки гормона роста (рилизинг-фактор, инсулиноподобный фактор и др.) у трансгенных животных выявлена повышенная скорость роста мышечной ткани и увеличение конечной живой массы. Полученные трансгенные мыши с геном гормона роста превосходили по скорости роста своих аналогов в 4 раза и имели вдвое большую живую массу. Несколько позднее были получены трансгенные по генам гормона роста кролики, свиньи и овцы, у которых также наблюдались определенные сдвиги по интенсивности роста и развития. Однако в отличие от данных, полученных на мышах, у трансгенных свиней в период эмбриогенеза не наблюдается существенных изменений по интенсивности роста по сравнению с интактными особями. Вместе с тем следует отметить повышенную скорость роста и увеличение массы внутренних органов у трансгенных эмбрионов в поздний плодный период [Волкова Н.А. и соавтр., 2007].

В последние годы активно изучается эффективность пересадки свиных фетальных клеток нервной ткани в лечении болезней Паркинсона и Хантингтона, эпилепсии. Предварительные клинические результаты свидетельствуют о способности пересаженных

свиных нейронов облегчать симптомы болезни Паркинсона. Сохранение жизнеспособности свиных нервных клеток и их интеграции в ткань головного мозга через 8 месяцев после пересадки было выявлено при аутопсийном иммуногистохимическом исследовании одного из 12 пациентов с болезнью Паркинсона, который умер от легочной эмболии (не связанной с клеточной трансплантацией). Изучалась эффективность лечения сахарного диабета путем трансплантации свиных островковых клеток. В течение 2 лет после пересадки была отмечена секреция свиного С- пептида, однако клинически значимой продукции инсулина не наблюдалось. Морфологическое исследование биоптатов подтвердило выживаемость свиных островков Лангерганса, имплантированных под капсулу почки пациентам с сахарным диабетом [Капанадзе Г.Д., Ашуев Ж.А., 2007].

Анализ литературных данных последних лет, свидетельствуют о возможности использования ксеногенной клеточной трансплантации для лечения целого ряда неизлечимых ранее заболеваний. К основным преимуществам ксеногенной клеточной терапии относятся возможность адекватной интеграции и функционирования чужеродных клеток в организме реципиента, преодоление дефицита аллогенного донорского материала, создание популяции трансгенных животных со сниженными иммуногенными свойствами определенных типов тканей, используемых для трансплантации. Вместе с тем, главным препятствием на пути широкого внедрения клеточной ксенотрансплантации в клиническую практику попрежнему являются реакция отторжения и трансплантат-ассоциированные инфекционные риски. В настоящее время в этом направлении активно проводятся доклинические исследования, которые, по мнению большинства исследователей, позволят в недалеком будущем в полной мере реализовать весь терапевтический потенциал ксеногенной клеточной трансплантации [Хрыщанович В.Я. и соавтр., 2012].

Свинья также является идеальным модельным животным для иммунологических исследований. Планцета свиньи практически не допускает переноса антител из кровотока матери к развивающемуся плоду, поэтому новорожденный поросенок лишен иммунных антител до получения первой дозы молозива. Это явление использовали для изучения всасывания антител, а также для исследования этапов развития физиологии пищеварения [Капанадзе Г.Д., 2011].

Гематологические показатели являются распространённым, доступным и надёжным

критерием оценки клинического и физиологического состояния животных. Они дают нам представление о процессах, происходящих в организме животного, и варьируют в зависимости от вида, породы, пола, возраста, физиологического состояния, условий кормления и содержания [Pearson P.L. et al., 1998; Vallet J.L. et al., 2003].

Развитие животных моделей, в которых гемопоэтические стволовые клетки человека могут приживляться и пролиферировать, имело фундаментальное значение в изучении гемопоэза человека. Наивысший уровень приживления получен с клетками пуповинной крови, далее с костномозговыми клетками и, наконец, с мобилизованными клетками периферической крови [Устюгов А.Ю., Румянцев С.А., 2014].

Результаты исследования крови свиней различных технологических групп позволили установить отличия по её морфологическим показателям как между животными разного пола, возраста, так и их физиологического состояния. [Elbers A.R.W. et al., 1994; Гимадеева Л.С., 2015].

В настоящее время достаточно актуальной является проблема развития кроветворения в эмбриональном периоде млекопитающих. Значительная часть болезней новорожденных, и в том числе нарушения эритропоэза, являются следствием патологии внутриутробного развития. Для уточнения этиологии и патогенеза различных видов аномалий развития плодов и новорожденных необходимы глубокие знания основ особенностей раннего эмбриогенеза. Выявление закономерности морфогенетических преобразований клеток в процессе дифференцировки позволяют уточнить временные границы стадий развития животного. Знание специфических особенностей развития животных на каждом этапе онтогенеза дает возможность управлять процессами роста и развития животных. Основная часть эмбриональной смертности происходит в первый месяц после оплодотворения. Причину внутриутробных потерь часто связывают с наличием критических периодов естественного развития в различные периоды пренатального онтогенеза, во время которых организм наиболее чувствителен к действию разнообразных агентов. Внешние факторы, к которым особенно велика чувствительность в эти периоды, могут ускорять, замедлять или приостанавливать развитие организма.

Чтобы избежать причины эмбриональной смертности, необходимы знания о наличии новых концепций периодизации развития, которые требуют более пристального внимания к

свиноматкам при развитии эмбрионов и плодов [Момот Ю.А., 2010]. Это свидетельствует о необходимости всесторонних и углубленных исследований биологии свиньи, в том числе анатомо-гистологического строения, с учетом породной и возрастной принадлежности животных, которые выступают в качестве «основных проблемных задач современной ветеринарной морфологии» и по разработке морфологических тестов с учетом периода онтогенеза и взаимосвязи особей с конкретными экологическими условиями [Башина С.И., Зайцева Е.В., 2012]

В доступной литературе содержатся единичные, носящие фрагментарный характер сведения, которые позволяют методически установить границы этапов развития животных [Магакян Ю.А. 1962; Никитченко В.Е., Никитченко Д.В., 2008; Тельцов Л.П., 2007; Тельцов Л.П и соавтр., 2008; Сахаров А.В., 2009; Озерной Е.В., Шевченко Б.П., 2014; Стёпочкин А.А. и соавтр., 2014].

1.6. Периодизация онтогенеза млекопитающих

Онтогенез эволюционно запрограммирован в генотипе. Он складывается из последовательных, строго регламентированных морфофункциональных процессов. Онтогенез протекает неравномерно и прерывно, в ходе его происходит качественная смена процессов, выражающаяся в изменении характера роста и дифференцировки. Без признания прерывности, или точнее неравномерности развития, нельзя понять механизм приспособительных ответных реакций организма на воздействия различных факторов внешней среды, эволюционные усложнения онтогенеза и его дискретную генетическую детерминацию. Свойством приспособляемости обладает всё живое (как на уровне организма, систем, органов, тканей, так и на уровне клетки).

Первый путь для управления онтогенезом – это детальное изучение периодизации развития животных в онтогенезе (вивогенезе). В настоящее время этой проблемой занимается наука – биология развития. Вобрав в себя концептуальные и методические достижения эмбриологии, генетики, цитологии, молекулярной биологии, физиологии и биохимии, эта наука всё более активно участвует в решении многих фундаментальных проблем, в том числе в исследовании функции генома на этапах и стадиях онтогенеза, в анализе контролирующих механизмов нормального и патологического развития. Однако до

сих пор не известно, как реализуется генетическая информация, содержащаяся в ядре оплодотворённой яйцеклетки, приводя к образованию множества типов клеток, тканей, органов и в конечном итоге целостного организма. По мнению ряда авторов, реализация генетического материала осуществляется по этапам развития [Стёпочкин А.А. и соавтр., 2014].

Все качественные и количественные изменения в онтогенезе подчинены главному биологическому закону - сохранению жизни путем приспособления к факторам внешней среды. Организм растет и развивается в определенной окружающей среде, воздействие которой на него очень многообразно. Поскольку на каждом этапе онтогенеза складываются различные условия жизни, то в процессе филогенеза сформировались животные, у которых формы и функции органов достаточно лабильны, благодаря чему они более полно приспособлены к этим условиям. Таким образом, чтобы управлять развитием организма, важно знать закономерности роста организма в целом и, в частности, развитие тканей в возрастном аспекте в условиях окружающей среды.

Систематические воздействия радиационных, токсических и других веществ приводят к нарушению обмена веществ, вызывают патологические изменения в организме, иммунологического статуса, функций нейрогуморальных систем и генетической структуры клетки. Наиболее опасны для организма эти воздействия окружающей среды в критические фазы развития. Поэтому изучение этапности (или стадийности) развития организма и его систем в онтогенезе, выявление критических фаз имеют не только теоретическое значение для фундаментальных наук, но и практическое – для зоотехников, животноводов, специалистов ветеринарной медицины [Стёпочкин А.А. и соавт., 2014].

Многочисленными исследованиями развития организма животных и его систем выявлены сроки критических фаз у млекопитающих в онтогенезе. Установлено, что организм животных на каждом этапе развития не реализует все свои возможности, запрограммированные в генотипе, он реализует только малую часть – фенотип. Доместикация животных и целенаправленный отбор позволили человечеству в короткий срок улучшить многие продуктивные возможности животных. Именно частичная реализация полезных качеств организма на разных этапах и стадиях создаёт благоприятные условия для целенаправленного вмешательства в управление развитием животных. Поэтому познание

этапов и стадий, а также критических фаз развития животных необходимо для учёных и практиков, так как даёт ключ для исследования изменчивости и возникновения новых свойств и признаков в пределах генетической детерминированности. Эти сведения являются биологической основой при разработке рациональных приёмов кормления, содержания и ухода за животными, а для ветеринарных врачей – для организации профилактических мероприятий по борьбе с заболеваниями.

Установлено, что критические фазы развития у млекопитающих животных протекают в двух формах: эволюционной (постепенной) и некробиотической (путём метаморфоза) [Светлов П.Г., 1966]. Каждая критическая фаза несёт свою специфическую возрастную морфофункциональную характеристику органов и систем организма. Однако все критические фазы развития организма животных имеют общие черты:

А. подводят итог развитию, результативности прошедшего этапа;

Б. в критические фазы развития у животных происходит:

1) смена одного этапа другим;

2) установка генетической программы на будущий этап;

3) десинхронизация биологических ритмов роста, развития органов и систем организма;

4) повышение чувствительности тканей, органов к лекарственным веществам и факторам внешней среды;

5) генетические мутации в клетках;

6) смена функций дефинитивных органов и морфофункциональных генераций.

На основании многолетних исследований установлены 8 законов индивидуального развития. Предлагается дефиниция законов индивидуального развития, которые открывают новые аспекты в изучении онтогенетической эволюции [Тельцов Л.П. и соавтр., 2010].

Первый закон. Индивидуальное развитие (вивогенез) человека и животных состоит из трех периодов – эмбриональный, постнатальный и зрелости. Каждый период включает несколько этапов жизни.

Второй закон. Наследственность человека и животных реализуется по этапам развития. На каждом этапе функционирует новый ген. Химический состав клеток и количественный набор клеточных дифферонов, морфологические и физиологические возможности тканей, органов и систем организма иные.

Третий закон. Взаимодействие соприкасающихся этапов развития протекает по принципу акселерации или ретардации. Частичная компенсация роста и развития возможна лишь на смежном последующем этапе. Компенсация прямо пропорциональна интенсивности воздействия в последующем этапе и обратно пропорциональна возрасту.

Четвертый закон. Критические фазы развития организма выявляются на стыке этапов. Активация рабочих генов осуществляется в сроки критических фаз, в которых происходит модификационная, мутационная и комбинированная изменчивость генов под влиянием внешних, внутренних факторов среды.

Пятый закон. Продолжительность критических фаз организма, органов и тканей зависит от глубины перестройки в последующем этапе.

Шестой закон. На каждом этапе развития организма и его систем, органов и тканей имеются свои, присущие только ему, биологические ритмы.

Седьмой закон. Непрерывность (перманентность) и плавность (иманентность) развития индивидуума в онтогенезе обусловлена асинхронностью и гетерохронностью составляющих его систем, органов и тканей организма.

Восьмой закон. Провизорность (временность) развития дефинитивных тканей, органов и систем, на каждом этапе компенсируется сменой (новой) морфофункциональной генерацией тканей, органов и систем организма.

Установлено, что организм млекопитающих (в том числе и человека) на каждом этапе развития с биологической точки зрения качественно другой: по химическому составу клеток, тканей, органов; по морфофункциональному значению составляющих систем и органов; по динамике биологических ритмов; по адаптационным возможностям интегрирующих систем и степени иммунологической защиты организма и т.д. Каждый этап, стадия, не говоря уже о периоде, имеют свои закономерности развития, высокую специфичность, свою биологическую значимость (табл.1).

Таблица 1

Возрастная периодизация онтогенеза человека

Периоды развития	Этапы развития	Стадии развития	Критические фазы
I. Внутриутробный период (от зачатия до рождения)	1. Ранний этап. Эмбриональный (от зачатия до 34 суток эмбриона)	Раннеэмбриональная (от зачатия до 34 суток) 1.1. Зиготы (до 1 сут.) 1.2. Дробления (2-12 сут.) 1.3. Гастрюляция (13-19 сут.) 2. Позднеэмбриональная или закладки осевых и временных органов (от 20 до 34 сут.)	1. Зиготы (до 1 сут.) на 10-14 сутки после менструации 2. Имплантации (на 15-19 сут. после оплодотворения) 3. Закладки временных органов (28-34 сут.)
	2. Средний этап (зародышевый от 35 до 60 сут.)	3. Раннезародышевая (35-45 сут.) 4. Позднезародышевая (46-80 сут.)	4. Закладка definitivoных органов (55-60 сут.)
	3. Поздний этап (плодный от 2 мес. до рождения)	5. Раннеплодная (от 61 суток до 5 мес.) 6. Среднеплодная (от 5 мес. до 7 мес.) Позднеплодная (от 7 мес. до рождения)	5. Функции definitivoных органов (5-5.5 мес.) 6. Рождения (за 3-5 суток до рождения)
II. Постнатальный период (от рождения до 21-25)	4. Новорожденный (от рождения до 10-15 сут.)	8. Новорожденности (от рождения до 10-15 сут.)	7. Новорожденности (от рождения до 8-10 сут.)
	5. Молочный (грудной) этап (от 10-15 сут. до 1 года)	9. Молочного питания (от 10-15 сут. до 1 года)	
	6. Детства – от 1 до 11 лет (д), от 1 года до 12 лет (м)	10. Раннего детства (от 1 до 3 лет) 11. Среднего детства (от 3 до 6 лет) 12. Позднего детства от 6 до 11 лет (д) от 6 до 12 лет (м)	8. Детства (на 6-6.5 году)
	7. Подростковый – от 11 до 15 лет (д) от 12 до 16 лет (м)	13. Подростковая (от 11 до 15 лет (д), от 12 до 16 лет (м))	9. Подростковая (от 11 до 15 лет (д), от 12 до 16 лет (м))
	8. Юношеской (от 15 до 21 года (д) от 16 до 25 лет (м))	14. Юношеская (от 15 до 21 года (д), от 16 до 25 лет (м))	10. Юношеская (20-21 году (д), 23-25 лет (м))
III. Зрелый (от 21-25 лет до физиологической смерти)	9. Зрелый (от 21 до 55 лет (ж), от 25 до 60 лет (мужчины))	15. Первой зрелости (от 21 до 48 лет (ж), от 25 до 45 лет (мужчины)). 16. Второй зрелости (от 48 до 55 лет (ж), от 45 до 60 лет (м))	11. Первой зрелости (от 48 до 50 лет (ж) от 43 до 46 лет (м)) 12. Второй зрелости (55-57 лет (ж), 60-64 лет (м))
	10. Пожилкой – от 55-60 до 75 лет (ж), от 60 до 75 лет (м)	17. Пожилая – от 55 до 75 лет (ж), от 60 до 75 лет (м)	13. Пожилых людей (75-78 лет (ж), 73-75 лет (м))
	11. Старческий этап (от 75 до 90 лет – мужчины и женщины)	18. Старческая (от 75 до 90 лет – мужчины и женщины).	14. Старческая (88-91 лет – м,ж)
	12. Долгожителей (от 90 лет и старше – м.ж.)	19. Долгожителей (от 90 лет и старше)	

Примечание: данные из таблицы 1 представлены согласно Тельцову Л.П. и соавтр., 2010.

Давно существует необходимость экстраполяции результатов экспериментальных исследований на человека. Общебиологические и медицинские эксперименты непосредственно на человеке не проводятся, а на приматах являются очень дорогостоящими, особенно. Большое количество исследований проводится на некрупных млекопитающих. Достаточно часто такими животными являются белые лабораторные крысы, так как они легки в содержании, быстро размножаются с коротким сроком беременности, а средняя продолжительность их жизни составляет 2 года (табл. 2).

Исходя из известного факта, что внутриутробный период человека продолжается 266 дней, т.е. 38 недель, а крысы – 21-22 дня (т.е. это соотношение K_1 в таблице, равно 11,6-12,1) был проведен сравнительный анализ морфометрических данных пренатального онтогенеза как человека, так и белых беспородных лабораторных крыс [Гелашвили О.А., 2008]. У человека внутриутробный этап имеет несколько периодов. Герминальный (собственно зародышевый) длится 1 неделю, т.е. 7 суток. Далее период имплантации – примерно 2 суток (40 часов). Эти два периода составляют фазу эмбрионального развития, которая в итоге длится 2-3 месяца. Следующая фаза получила название плацентарного развития и представлена следующими тремя периодами. Эмбриональный период длится 5-6 недель, но критическим сроком считается период с 3 до 7 недель. Неофетальный (эмбриофетальный) период – 2 недели. Завершающий период (фетальный) – от 9 недель и до рождения, в котором различают ранний фетальный – от 9 до 28 недель и поздний фетальный – от 28 недель до рождения.

Учитывая приведенную выше периодизацию пренатального онтогенеза человека, можно сравнить ключевые периоды развития человека с периодами развития белой крысы. Таким образом, фаза эмбрионального развития человека соответствует 1 неделе (или 7 суткам) развития крысы. Фаза плацентарного развития человека соответствует следующим 10 суткам развития крысы – ранний фетальный период человека, а поздний фетальный – 4 завершающим суткам внутриутробного развития крысы.

При проведении сравнительного анализа пропорциональных возрастных соотношений в постнатальном онтогенезе был произведен расчет коэффициента, исходя из того, что 120-суточная крыса по возрасту соответствует позднему пубертатному периоду человека, или 17 годам жизни человека, что составляет 204 месяца. Следовательно, отношение числа месяцев

жизни человека к дням жизни крысы равно 1,7 (K_2 в таблице). Необходимо добавить, что исчисление того же коэффициента, учитывая, что 120 дней жизни крысы равняется 7 неделям и 1 дню. Отношение числа лет жизни человека (17 лет) к числу недель жизни крысы равно 1 (K_3 в таблице). То есть 1 неделя жизни крысы соответствует примерно 1 году жизни человека. Учитывая, что 1 год состоит из 365-366 дней, было получено более точное соответствие: 1 день жизни крысы равен 52 дням жизни человека.

Таблица 2

**Соответствие сроков развития крысы и человека
в пренатальном и постнатальном онтогенезе**

ОНТОГЕНЕЗ					
пренатальный			постнатальный		
крыса	человек		крыса	человек	
	$K_1-11.6=12.1$			$K_2-1.7$	K_2-1
сутки	сутки	недели	сутки	мес	мес
1	11.6-12.1	1.6-1.7	1	1.7	1.5
2	23.2-24.2	3.3-3.4	2	3.4	3.5
3	34.8-36.3	4.9-5.1	5	8.6	8.5
4	46.4-48.4	6.6-6.9	10	17	17.3
5	58-60.5	8.2-8.6	15	25.5	26
6	69.6-72.6	9.9-10.3	30	51	52
7	81.2-84.7	11.6-12.1	45	76.5	78
8	92.8-96.8	13.2-13.81	60	102	104
9	104.4-108.9	14.9-15.5	90	153	156
10	116-121	16.4-17.2	120	204	208
11	127.6-133.1	18.2-19			
12	139.2-145.2	19.8-20.7			
13	150.8-157.3	21.5-22.4			
14	162.4-169.4	23.2-24.2			
15	174-181.5	24.8-25.9			
16	185.6-193.6	26.5-27.6			
17	197.2-205.7	28.1-29.3			
18	208.8-217.8	29.8-31.1			
19	220.4-229.3	31.4-32.8			
20	232-242	33.1-34.5			
21	243.6-254.1	34.8-36.3			
22	255.2-266.2	36.4-38			

Примечание: данные из таблицы 2 представлены согласно Гелаивили О.А., 2008

Конечно, системы органов белой лабораторной беспородной крысы не могут быть уменьшенным подобием систем органов человека, как, в принципе, и ребенок не является «взрослым в миниатюре».

Предложена новая детальная периодизация онтогенеза свиней на основе синтетического подхода разных методических концепций (табл. 3). В основу периодизации заложено: 1) морфофункциональное развитие самого эмбриона, зародыша, плода и животных после рождения; 2) изучение периодизации развития не только организма, но и его систем, органов и тканей; 3) смена генераций дефинитивных (окончательных) органов в постнатальном онтогенезе. Предложенная концепция периодизации развития свиней впервые позволяет установить не только границы этапов и стадий развития, но и критические фазы развития животных.

В отличие от других видов млекопитающих, у свиней выявляются некоторые особенности роста. Первой особенностью является низкая скорость роста в эмбриональном периоде. Необходимо добавить, что по абсолютной скорости роста в эмбриональный период свиньи уступают овцам в 2,4 раза, кроликам в 4,9, крупному рогатому скоту в 11,8 и лошадям в 14 раз. В постэмбриональный период, по сравнению с эмбриональным периодом, скорость роста у свиней увеличивается в 21,7 раза, у лошадей только в 1,8 раза, а у кроликов этот показатель даже уменьшается в 5 раз [Никитченко В.Е., Никитченко Д.В., 2008].

Следующей видовой особенностью роста свиней является интенсивность (относительная скорость) роста. Этот показатель считается феноменом роста этого вида животных. У свиней интенсивность роста в 15-20 раз выше, чем у самых крупных сельскохозяйственных животных. Об этом можно судить по кратности увеличения живой массы. У крупного рогатого скота масса к моменту окончания их роста увеличивается по сравнению с живой массой новорожденных в 10-14 раз, у свиней - в 208 раз. Большинство млекопитающих интенсивнее растет до полового созревания, а у свиней это явление менее выражено. Но у свиней относительная длительность постнатального роста значительно больше, чем у других видов сельскохозяйственных животных. Так, продолжительность роста в постнатальный период больше эмбрионального у свиней в 9,6, крупного рогатого скота - в 5,9 и у овец - в 4,8 раза. Отсюда вытекает, что сочетание большой длительности роста с исключительно высокой его интенсивностью в постнатальный период составляет третью видовую особенность роста свиней [Никитченко В.Е., Никитченко Д.В., 2008].

Вивогенез свиней крупной белой породы

Период	Этап развития	Стадии развития	Критические фазы
1. Внутриутробный (от зачатия до рождения)	1. Начальный (от зачатия до 25 сут. эмбриогенеза), эмбриональный	1. Зиготы (от оплодотворения до 1 сут.) 2. Дробления (от 2 до 6 сут.) 3. Гастрюляции (от 7 до 14 сут.) 4. Закладки осевых и временных органов (от 15 до 25 сут.)	1. Зиготы (от оплодотворения до 1 сут.) 2. Имплантации (6-8 сут.) 3. Закладки временных органов (24-26 сут.)
	2. Средний (от 26 до 40 сут.), зародышевый	5. Раннезародышевая (от 26 до 34 сут.) 6. Позднезародышевая (35 до 40 сут.)	4. Закладки дефинитивных органов (от 30 до 40 сут.)
	3. Поздний (от 40 до 115 сут.), плодный	7. Раннеплодная (41 до 70 сут.) 8. Среднеплодная (от 71 до 90 сут.) 9. Позднеплодная (от 91 до 115 сут.)	5. Формирование функций дефинитивных органов (85-90 сут.) 6. Перед рождением (2-3 сут.)
2. Постнатальный (от рождения до формирования половой зрелости до 6 мес.)	4. Новорожденности (от рождения до 4 сут.)	10. Новорожденности (от рождения до 4 сут.)	7. Новорожденности (от рождения до 4 сут.)
	5. Молочный (от 5 до 60 сут.)	11. Первая молочная (от 5 до 21 сут.) 12. Вторая молочная (подкормки) (от 22 до 45 сут.) 13. Отъема (от 46 до 60 сут.)	8. Отъема (40-50 сут.)
	6. Переходный (от 61 до 120 сут.) отъемыши	14. Переходная (от 61 до 120 сут.)	
	7. Завершенный этап полового созревания (от 121 сут. до 6 мес.) ремонтный молодняк	15. Полового созревания (от 4 до 6 мес.)	9. Полового созревания (5-5.5 мес.)
3. Зрелый (от полового созревания до смерти)	8. Истинной зрелости (от 6 мес. до 8 лет) 9. Геронтологический (от 8 лет и старше)	16. Истинной зрелости (от 6 мес. до 8 лет) 17. Геронтологический (от 8 лет и старше)	10. Формирования истинных дефинитивных органов (10-12 мес.) 11. Формирования старческих органов (8-10 лет)

Примечание: данные из таблицы 3 представлены согласно Степочкину А.А. и соавтр., 2014.

Процесс роста у самцов и самок протекает неодинаково. Начиная со второго месяца жизни самцы растут быстрее самок. Именно высокие темпы прироста в сочетании с длительностью интенсивного роста обеспечивает хрякам по сравнению с матками более высокую живую массу во взрослом состоянии. Из этого следует, что великорослость - один из биологических резервов повышения скорости роста животных. У свиней отдельные показатели роста значительно колеблются в зависимости от породы, пола, индивидуальных особенностей и кормления. Большой скоростью роста и великорослостью отличаются свиньи крупной белой породы [Никитченко В.Е., Никитченко Д.В., 2008].

Многочисленными исследованиями ученых всего мира, доказано, что организм на каждом этапе развития не реализует всех своих возможностей, запрограммированных в генотипе, а реализуется только часть, называемая фенотипом, то есть на каждом этапе есть резерв. Этот генетический резерв нужен не только для развития, роста человека и получения продуктивности у животных, но и для адаптации, для развития умственных и физических возможностей человека. У человека генотип за весь вивогенез используется до 10-12%. Очевидно и резерв адаптации человека используется в этих же пределах [Тельцов Л.П. и соавтр., 2010].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В опыте использовались 36 здоровых свиноматок большой белой породы. Используемые нами животные закупаались, покрывались и проводили весь срок беременности в сельскохозяйственных фермах. Здоровье подопытных животных, а также течение беременности проверялись ветеринарами. В течении эксперимента свиноматки содержались отдельно от самцов и по достижении веса 130-140кг в возрасте 11-12 месяцев начинали проявлять готовность к спариванию. Половая охота у свиноматок длилась около 2-х суток. За это время хряк-осеминитель покрывал ее 2 раза. Первый – через 12 часов после начала половой охоты, второй – через 12 ч. после первого контакта. После чего начались забой супоросных свиноматок для изучения роста и развития зародышей и плодов. Для изучения постнатального эритропоза использовались новорожденные (возраст до 1 недели), трех месячные поросята и половозрелые свиньи (возрастом свыше 6 месяцев). Все постнатальные животные использовались по четыре особи.

Первый забой был произведен через 240 часов после покрытия, после чего забой следовали на 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75 и 90 дни супоросности. Каждый раз забивалось не менее 3 животных. Эвтаназия свиней проводилась согласно протоколу Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, AVMA Guidelines (Institutional Review Board/Independent Ethics Committee of the Institute of Molecular Biology of NAS, IRB00004079).

Полученные после забоя матки с находящимися в них зародышами доставлялись как можно быстрее в лабораторию, где и проводились все исследования. На более ранних сроках супоросности (10-15сутки) зародыши извлекались из рогов матки при помощи промывания рогов физиологическим раствором Рингера. Для этого рога матки отделялись от связок и удалялись яйцеводы. Рог матки вытягивался во всю длину и в него вводилось около 20 см³ раствора по направлению от яйцевода к матке (рис. 5).

Выделяющийся с противоположного конца раствор вместе с вымытыми зародышами собирался в эмалированные темноокрашенные кюветы размером 30×40 см, куда для облегчения работы с зародышами приливалось еще около 100-150 см³ раствора.



Рисунок 5. Промывание рогов матки.

После измерения длины плодных оболочек, они вскрывались, и извлекался зародыш. Размеры зародышей на этих сроках определялись под лупой с увеличением в 5 раз при помощи винтового окуляра микрометра. Все полученные зародыши сопоставлялись по длине, весу и морфологическим признакам со сроком гестации [Odlaug T.O., 1955; Patten В.М.,1948].

На более поздних сроках супоросности зародыши свиньи представляют собой очень удобный объект для исследования их анатомии и гистологии, т.к. они уже обладают достаточно большими размерами, что упрощает обращение с ними, но в то же время еще не столь велики, чтобы это затруднило гистологическую их обработку. Они хорошо режутся при приготовлении серийных срезов и прекрасно окрашиваются, что дает возможность получить очень четкие, контрастные препараты.

Сначала матка с зародышами фотографировалась, затем взвешивалась с зародышами, после чего осторожно, чтобы не повредить оболочек зародышей, вскрывалась (рис 6). Осторожно извлекались зародыши, фотографировались в своих оболочках, а затем взвешивались матка без зародышей и зародыши вместе с оболочками и жидкостями.

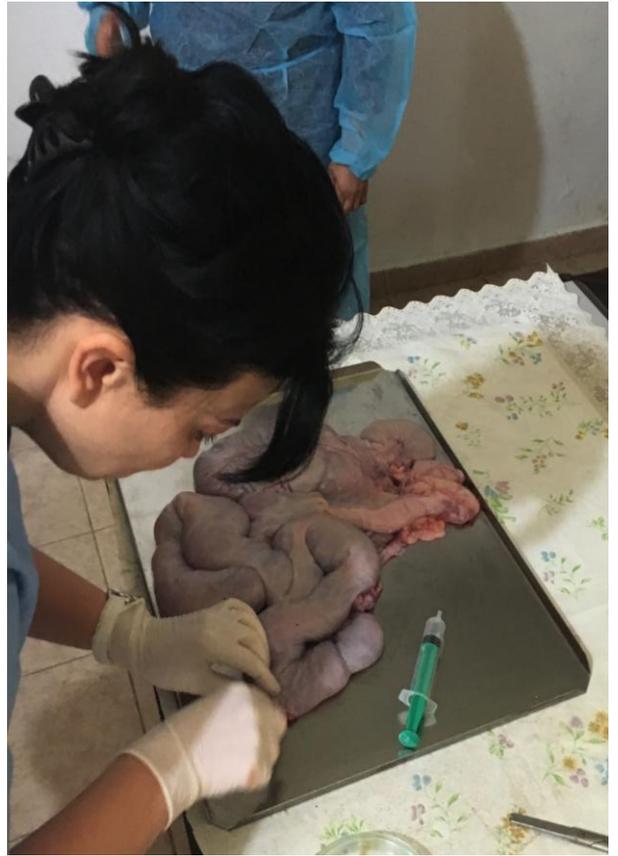


Рисунок 6. Извлечение зародышей свиньи.

После этого вскрывался амнион, извлекался зародыш и взвешивался. Кроме того, брались промеры длины туловища зародыша (от затылочного гребня до корня хвоста) и длина головы (рис. 7).

Во время изучения полученного материала мы пользовались различными методами анатомического и гистологического анализа.

В качестве фиксаторов для исследуемых образцов эмбрионов для гистологических исследований использовались жидкости Ценкера, Флемминга и Буэна. Пробы заливались в парафин с последующим изготовлением серийных гистологических срезов толщиной в 5-8 микрон. Препараты окрашивали гематоксилином по Вейгерту и по Карачи с докраской эозином, азаном по Гейденгайну, а также азаном по Маллори, азур-эозином по Гимза. Изготовление биоптатов, отпечатков и мазков проводилось рутинным методом [Ромейс Б., 1953].



Рисунок 7. Измерение зародышей свињи на разные сутки внутриутробного развития.

Окрашивание азаном по методу Гейденгайна

Основной методикой окраски для оценки морфологических и цитоморфометрических измерений, явилась сравнительно редко применяемая окраска азаном по методу Гейденгайна, которая является модификацией метода Маллори. Это методика позволяет получить более четкое окрашивание соединительной ткани, чем основной метод, а употребление сулемовых фиксаторов для окраски срезов улучшает качество окраски. Таким образом, во всех исследованиях с употреблением методики окрашивания азаном по Гейденгайну, использовалась фиксация по Ценкеру [Меркулов Г.А., 1961].

Приготовление растворов:

1. Раствор азокармина – к 100мл дистиллированной воды добавляют 0,1 г азокармина. Затем в течение нескольких минут кипятят и после охлаждения профильтровывают. К фильтрату добавляют 1 мл ледяной уксусной кислоты.
2. Раствор анилинового синего и оранжевого G - к 100мл дистиллированной воды добавляют 0,5 г анилинового синего, 2,0 г оранжевого G. Смесь кипятят в течение 2-3 минут, охлаждают и профильтровывают. Перед употреблением раствор разводят в 2-3 раза дистиллированной водой.
3. Раствор анилинового спирта – в 100 мл 90% спирта растворяют 0,1 мл анилинового масла (практически удобнее 1,0 мл анилинового масла растворить в 1 л спирта).

4. Уксуснокислый спирт – к 100 мл 96% спирта добавляют 1 мл ледяной уксусной кислоты.
5. Раствор фосфорно-вольфрамовой кислоты – 5 мг химически чистого препарата растворяют в 100 мл дистиллированной воды.

Окрашивание срезов проводят следующим образом:

1. Срезы переносят в раствор азокармина и помешают на 1,5- 2 часа в термостат с температурой 56-60 градусов. Срезы для этого помешают в хорошо закрывающиеся биологические стаканчики (или бюксы) с притертой пробкой.

2. Далее стаканчик со срезами охлаждают при комнатной температуре в течение 10-15 минут.

3. Срезы извлекают из стаканчиков (или бюкса), ополаскивают в дистиллированной воде.

4. Срезы переносят в раствор анилинового спирта и выдерживают до тех пор, пока не будут четко выявлены ядра (контроль под микроскопом). Если не удастся долго выявить ядра, можно добавить в раствор дистиллированной воды, что ускорит процесс дифференцировки;

5. После дифференцировки ядер быстро промыть в течение 1-2 минуты уксуснокислым спиртом.

6. Протрава срезов в растворе фосфорно-вольфрамовой кислоты в среднем в течении 1-3 часов в зависимости от выявления элементов соединительной ткани под контролем микроскопа.

7. Ополаскивание в дистиллированной воде и переносят в разведенный раствор анилинового синего и оранжевого G – в течение 2-3 часов, после чего быстро ополаскивают в дистиллированной воде и переносят в 96% спирт для дифференцировки.

Морфологический анализ эритроидных клеток

Морфологический анализ эритроидных клеток периферической крови, АГМ области, желточного мешка, печени, селезенки и костного мозга на различных этапах онтогенеза свиней проводили на препаратах, окрашенных по Гимза (Ромейс Б., 1954). Определяли состав всех морфологически выявляемых клеток, их процентное соотношение, число мертвых клеток среди них. Для того, чтобы выяснить общие и отличительные стороны

раннего развития эритроидных клеток в эмбриогенезе различных млекопитающих нами было проведено исследование раннего эритропоэза крыс и его сравнение с эритропоэзом свиньи.

При этом, исследовали эритроидные клетки периферической крови эмбрионов крыс в период с 12-й по 17-ю стадию эмбрионального развития включительно (с 11-х по 15-е сутки беременности, по 5 эмбрионов на возраст). На каждый срок бралось 5 самок крысы, от каждой крысы бралось по одному эмбриону. Приготовление препаратов, фиксация материала и окраска аналогичны таковым у свиней. На этих же препаратах подсчитывали число делящихся клеток и определяли митотический коэффициент в процентах, исходя из числа митозов на 100 клеток в каждом случае. Стадийность определялась согласно классификации Карнеги (табл. 4).

Анализ препаратов проводили под световым микроскопом с использованием компьютерной программы Labkit Standart v1.1en и «ImageJ».

В последнее время появилось несколько различных классификаций эритроидных клеток. В наших исследованиях мы используем классическую терминологию, однако для удобства восприятия ниже приводим более современную классификацию по Schlam's [Douglas J.W., Wardrop K.J., 2010].

Классификация по Schlam, 2010	Используемая Классификация
Рубрибласт	Проэритробласт
Прорубрицит	Базофильный эритробласт
Базофильный рубрицит	Базофильный эритробласт
Полихроматофильный рубрицит	Полихроматофильный эритробласт
Метарубрицит	Ортохромный эритробласт
Ретикулоцит	Ретикулоцит
Эритроцит	Эритроцит

Помимо выше упомянутых классификаций, для определения, а также сравнения стадии эмбриогенеза у различных видов позвоночных была применена классификация стадий Карнеги (табл. 4), основанная на внешнем и внутреннем морфологическом развитии зародышей позвоночных, критерии которых включают возраст (дни), количество сомитов и длину зародыша [https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/File:Carnegie_-_stages_species_comparison.jpg].

Сравнение эмбрионального развития по стадиям

Вид	Стадии															
	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
Человек	20	22	24	28	30	33	36	40	42	44	48	52	54	55	58	
Обезьяна	21	22	25	28	29	30	32	34	36	37	38	40	42	44	46	
Мышь	9	9.5	10	10.5	11	11.5	12	12.5	13	13.5	14	14.5	15	15.5	16	
Крысы	10.5	11	11.5	12	12.5	13	13.5	14	14.5	15	15.5	16	16.5	17	17.5	
Кролики	8	8.5	9.5	10.5	11	12	12.5	13.5	14	14.5	15.5	16	16.5	17	18	
Овцы	15	16	17.5	18.5	19.5	20.5	22	23	24.5	25.5	27.5	29.5	30	33		
Свиньи	14	15	16	17	18	19	20.5	21.5	23	24	25.5	27.5	29	30.5	32.5	
Куры	1	1.5	2	2.25	2.5	3	3.25	3.75	4.75	5.5	6.25	7.25	7.75	8.5	10	
Собаки						27	28	29	30	34	36	37				

Морфометрический анализ АГМ области

Размер кроветворной ткани АГМ области определялся на срезах препаратов с помощью программного обеспечения «ImageJ». В каждом случае использовалось не менее четырех срезов АГМ области, а в каждом срезе рассматривалось не менее 30 полей зрения на малом увеличении 0,4 мм².

Морфометрический анализ печени

Размер кроветворной ткани эмбриональной печени определялся на срезах препаратов с помощью программного обеспечения «ImageJ». В каждом случае использовалось не менее четырех срезов печени, а в каждом срезе рассматривалось не менее 30 полей зрения на малом увеличении 0,4 мм². Поля зрения выбирались случайным путем, исключая капсулу печени.

Морфометрический анализ селезенки

Размер кроветворной ткани эмбриональной селезенки определялся на срезах препаратов с помощью программного обеспечения «ImageJ». В каждом случае использовалось не менее четырех срезов селезенки, а в каждом срезе рассматривалось не менее 20 полей зрения на малом увеличении 0,4 мм². Поля зрения выбирались случайным путем.

Морфометрический анализ костного мозга

На ранних этапах эмбрионального развития костный мозг исследовался на срезах хрящевых зачатков скелета свиньи. Затем изучались отпечатки органа [Ромейс Б., 1953].

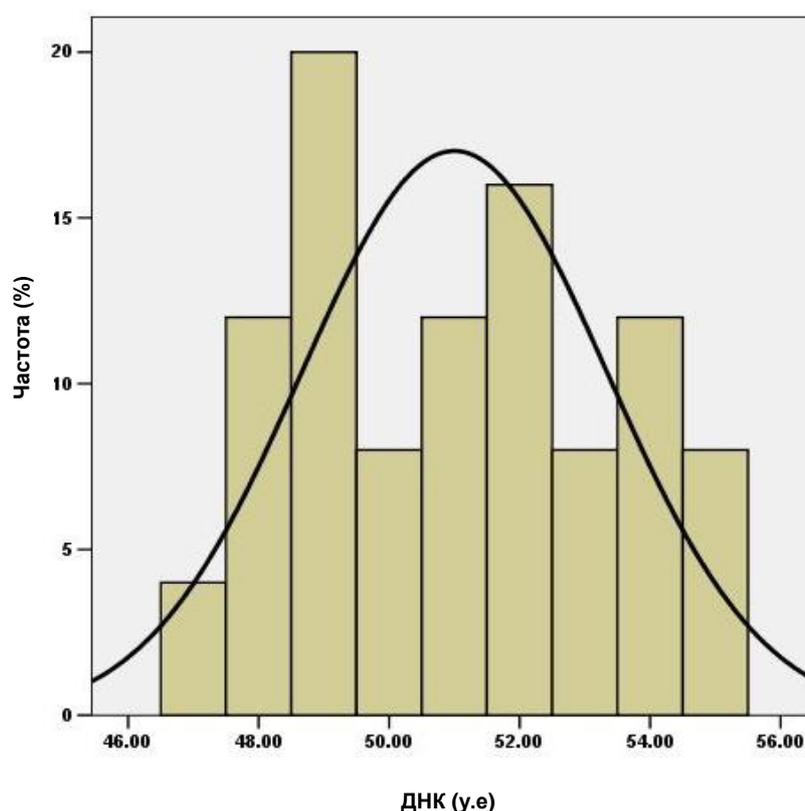
Окраска ДНК по Фельгену и цитоспектрофотометрия ДНК

Для цитохимических исследований зафиксированные на предметном стекле препараты одновременно окрашивали реактивом Шиффа по Фельгену. Гидролиз ДНК проводили в 5N HCl в течение 1 часа при 22°C [Магакян Ю.А., Каралова Е.М., 1989]. Количественное определение комплекса ДНК-фуксин, площади ядер и ядрышек всех исследуемых форм эритроидных клеток на мазках периферической крови и отпечатках костного мозга производили при длине волны 575 нм с визуализацией изображения (увел. 100x1.30), созданном на базе микроскопа-фотометра SMP 05 (OPTON, ФРГ), оснащенного компьютером. В каждом случае производили измерения в 100 ядрах. Вычисляли среднее содержание ДНК в ядре и ядрышках (в условно сравнимых единицах), определяли площадь ядер и ядрышек и высчитывали среднее число ядрышек на ядро. На основании полученного материала по содержанию ДНК в ядрах строились гистограммы их распределения по классам плоидности. Для их построения определяли стандартное диплоидное количество ДНК в ядрах лимфоцитов периферической крови здоровых свиней, которое строго соответствует содержанию ДНК в диплоидной популяции в фазах G₀/G₁ клеточного цикла.

Распределение ядер стандарта (лимфоидные клетки) демонстрируют нормальное распределение вариационного ряда с соответствующей кривой (график 1).

График 1

Распределение ядер диплоидных клеток
(лимфоцитов) половозрелых свиней по содержанию ДНК



Цитоморфометрия

Для цитоморфометрического анализа размеров ядрышек, ядер, цитоплазмы и клеток использовалась стандартная компьютерная программа открытого доступа «ImageJ», которая позволяет исследовать в одной и той же клетке площадь цитоплазмы, ядра и суммарно ядрышек. Все размеры клеток даны в $\mu\text{м}^2$.

Окраска белка нафтоловым желтым и цитоспектрофотометрия белка

Для вычисления общего белка в заранее приготовленные препараты были окрашены нафтоловым желтым. Техника окраски проводилась рутинным методом [Gaub J., et al, 1975]. Измерение оптической плотности белка клетки проводились на длине волны 434 нм на цитоспектрофотометре SMP 05 Opton. Для цитометрического анализа размеров клеток использовалась компьютерная программа «ImageJ».

Окраска РНК галлоцианин-хромовыми квасцами и цитоспектрофотометрия РНК.

Использовался галлоцианин фирмы Aldrich. Краситель кипятили 10 мин (150 мг галлоцианина, 5 г хромовых квасцов, 100 мл воды), после чего раствор фильтровали переливали в сосуд объемом 100 мл и с помощью HCl или NaOH устанавливали pH раствора красителя 1.64 [Wied G.L., 1966]. Для окрашивания использовались свежеприготовленные растворы красителя. Окрашивание производилось в течение 48 часов, затем препараты промывали 30 мин водопроводной водой. Для обезвоживания использовались 70%, 95% и абсолютный спирты, каждый в течение 5 мин. Окрашивание всех препаратов проводилось одновременно. Для анализа изменений количества РНК, значение контрольной популяции клеток принимались за 100%.

Измерение оптической плотности РНК проводились на длине волны 620 нм на цитоспектрофотометре SMP 05 Opton. Для цитометрического анализа размеров клеток использовалась компьютерная программа «ImageJ».

Цитоспектрофотометрия неокрашенного гемоглобина в различных эритроидных клетках

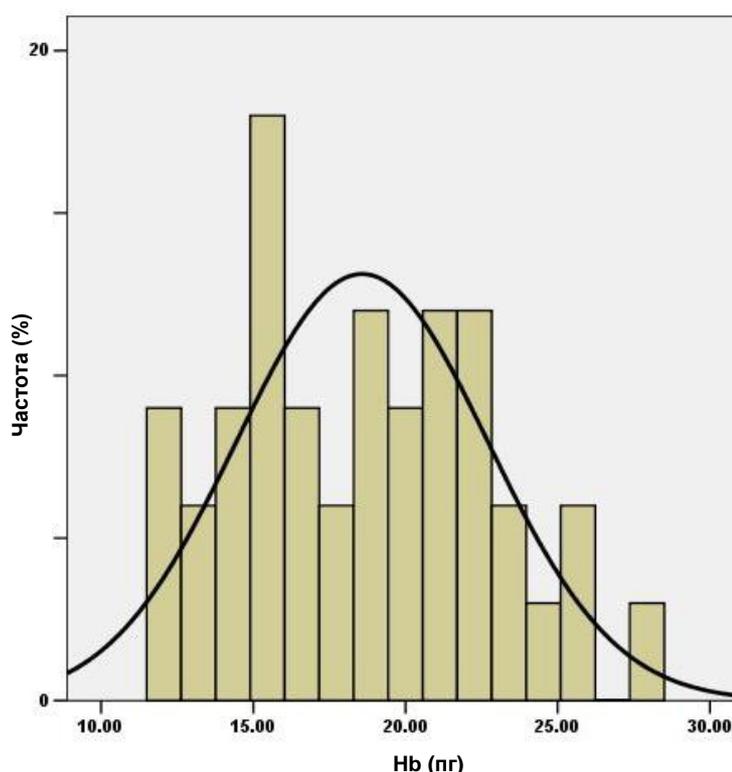
Измерение количественных изменений гемоглобина (Hb) проводилось на неокрашенных препаратах эмбрионов свиней и на неокрашенных мазках периферической крови.

Спектральные свойства оксигемоглобина характеризуются наличием двух полос поглощения в желто-зеленой части видимого спектра, одна из которых, лежащая ближе к красной области спектра, обозначается как α -полоса; другая, с более короткой длиной волны,

более широкая и с менее резкими краями, - как полоса β . В фиолетовой части спектра лежит весьма интенсивная полоса поглощения, обозначаемая как γ (1) -полоса (или полоса Сорэ). Максимум α -полосы поглощения HbO_2 находится в области длин волн 575-579 нм, максимум β -полосы приходится на 540-544 нм. При этом, γ (1)-полоса имеет максимум в интервале 410-416 нм. Между α - и β -полосой минимум при 560 нм. α -, β - и γ -полосы характерны для группы гема. Считается, что γ -полоса обусловлена порфирином протетической группы. С учетом данных литературы общую фракцию гемоглобина регистрировали спектрофотометрически по наличию спектров и поглощению в области γ (1)-полосы Сорэ: оксигемоглобин поглощает при максимуме 411-414 нм, метгемоглобина – при максимуме около 406-408 нм, Гемоглобин без кислорода, дезоксигемоглобин, имеет максимумы поглощения на длинах волн 430 нм [Heimpel H. et al, 1977].

График 2

Распределение эритроцитов половозрелой свиньи по содержанию гемоглобина (Hb) на спектре поглощения УФ (длина волны 414 нм)



Распределение эритроцитов по содержанию гемоглобина - выраженная в цифрах величина, связанная со степенью различия эритроцитов, по содержанию гемоглобина, в популяции. Расчет этого показателя проводится на неокрашенных препаратах на

ультрафиолетовой длине волны. Данный показатель необходимо анализировать вместе гистограммой распределения содержания гемоглобина в эритроцитах (график 2).

Регистрируемая кривая в норме, должна подчиняется закону нормального (гауссова) распределения. Гистограмма должна начинаться и заканчиваться на базовой линии и между нижним и верхним дискриминатором. По горизонтали откладывается содержания гемоглобина в пикограммах (пг), вертикальная ось на графике фиксируется как 100% шкала.

Нормальная эритроцитарная гистограмма имеет симметричную (куполообразную) форму.

Измерение оптической плотности гемоглобина проводились на цитоспектрофотометре SMP 05 Opton. Для цитометрического анализа размеров клеток использовалась компьютерная программа «ImageJ».

Характеристики компьютерного анализа.

В каждом эксперименте, на каждой исследованной точке, было проанализировано от 100 до 300 клеток, с помощью применения разных методов, которые позволили осуществить анализ в препаратах, полученных из периферической крови, желточного мешка, печени, селезенки и костного мозга на различных этапах онтогенеза свиней. В изучаемых препаратах подсчитывали процентное соотношение всех эритроидных клеток. Анализ препаратов проводили под световым микроскопом (REFLECTED LIGHT FLUORESCENCE MICROSCOPE L2001 Series User Guide) с использованием программы Labkit Standart v1.1en. Измерение размеров клеток был сделан использованием рутинной цитометрии с помощью компьютерной программы «ImageJ».

Исследование цитокинов в сыворотке периферической крови

Изучение сывороточных уровней материнских колониестимулирующих факторов проводилось с помощью твердофазный иммуноферментного анализа (ИФА). Изучались наиболее важные для пролиферации и дифференцировки макрофагов факторы - гранулоцит-макрофаг колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ), макрофаг колониестимулирующий фактор (М-КСФ). Также исследовался эритропоэтин - важнейший цитокин, являющийся основным регулятором эритропоэза.

По своему принципу твёрдофазный иммуноферментный анализ ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) метод иммунохимического выявления растворимых биомолекул, содержащихся в жидкостях организма. В ELISA используется твёрдая полимерная

матрица (96 луночный полистироловый планшет), на которой предварительно иммобилизуются антитела против белка-мишени. Антитела к определенному веществу (цитокины, иммуноглобулины) сорбируют на поверхности лунок пластика планшет. В лунки планшета с антителами вносят биологический материал, содержащий антиген. Последний избирательно связывается с фиксированными специфическими антителами. Затем несорбированные белки отмывают специальным раствором и в лунки добавляют конъюгат, содержащий специфичные к данному антигену антитела иной видоспецифичности и фермент (пероксидаза хрена). Антитела конъюгата связываются с фиксированным в лунке антигеном. После добавления в данную систему хромогенного субстрата (ортофенилендиамина) последний расщепляется ферментом конъюгата, в результате чего изменяется цвет раствора в лунке. Интенсивность окрашивания пробы исследуемого материала прямо пропорциональна содержанию в ней искомого антигена (цитокина). Учет интенсивности реакции опытных и контрольных проб проводят на специальных спектрофотометрах при длине волны 540 нм.

Использовались коммерческие наборы фирмы Elabscience Biotechnology Co., Ltd. Уровни всех колониестимулирующих факторов оценивались в пг/мл, а эритропоэтина в нг/мл. ELISA Kit: Эритропоэтин E-EL-P1509; М-КСФ E-ER-P0845; ГМ-КСФ E-EL-P2267.

Определение колониестимулирующих факторов и эритропоэтина проводилось в сыворотке периферической крови семи здоровых свиноматок до беременности (исходная группа) и в процессе беременности (на 15, 25, 35, 45, 70, 77, 85, 90 дни гестации). Около 4мл крови брали из глазной вены всех участвующих в опыте свиней. Отделение сыворотки для иммуноферментного анализа реакции осуществлялось путем осаждения форменных элементов крови. До проведения иммуноферментной реакции сыворотки хранили при температуре -85°C как контрольных, так и беременных животных. Максимальный срок хранения сывороток 60 дней. Достоверность определяли методом малых выборок по Вилкоксону-Манну-Уитни.

Статистическая обработка

Все полученные экспериментальные данные были обработаны методами вариационной статистики с использованием пакета прикладных программ для статистической обработки “MS Excell 2010” с использованием раздела программы “Анализ данных”, подраздела “Описательная статистика”.

В каждой группе для всех признаков вычисляли среднее арифметическое, стандартное отклонение и среднюю ошибку среднего арифметического. Достоверность различий между средними значениями определяли по статистическому критерию t-Student. При непараметрическом распределении признаков использовался u-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни, корреляционный анализ проводили по Пирсону с помощью программы SPSS 17.0 (SPSS, INC., Chicago, IL) с оценкой коэффициента корреляции - r.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ЭМБРИОНАЛЬНОГО ЭРИТРОПОЭЗА СВИНЕЙ

3.1. Периодизация внутриутробного развития свиней.

Основываясь на собственные исследования, а также проанализировав литературные данные [Patten В.М., 1948; Тельцов Л.П. и соавт., 2010; Степочкин А.А. и соавт., 2014], мы разделили внутриутробный отрезок жизни животного на 2 больших периода: зародышевый и плодный.

Зародышевый период распространяется на отрезок эмбрионального развития свиньи от момента оплодотворения до формирования особи, в основных чертах своего строения сходной с молодым организмом данного вида. Этот период продолжается у свиней примерно до 45-го дня внутриутробного развития. По морфологическим признакам зародышевый период развития свиньи делится на 5 фаз:

1. Фаза дробления и закладки зачатков зародышевого узелка и трофобласта, который продолжается до 5-х суток включительно с момента оплодотворения.

2. Фаза закладки и развития зародышевых листков, целомической мезодермы и образования нервной пластики, которая продолжается с 5-х до 10-х суток включительно. Эритропоэтическая функция у зародышей нами не выявлена и следовательно отсутствовали клетки синтезирующие гемоглобин.



Рисунок 8. Сагитальный срез на 15 сутки внутриутробного развития зародыша свиньи.

Окраска азаном по Маллори. Увеличение 25X.

3. Фаза первичной дифференциации зародыша. Длится с начала 11-х до 15-х суток зародышевого развития. Характеризуется тем, что за этот сравнительно короткий период в течении 5 суток происходит значительное увеличение размеров зародыша. В этой фазе осуществляется образование осевых органов, примитивная дифференцировка головного мозга, сомитов, формируется первичное сердце, впервые начинает функционировать система зародышевого кровообращения, закладывается печень и первичная почка, осуществляется ранняя дифференцировка пищеварительного канала (рис.8, 9, 10).

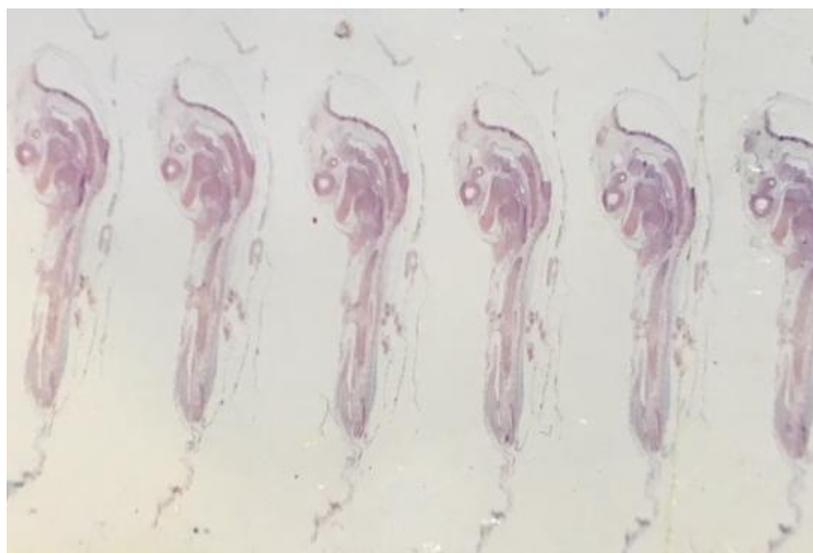


Рисунок 9. Сагитальный срез эмбриона свиньи на 15 сутки внутриутробного развития.

Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение 15X.

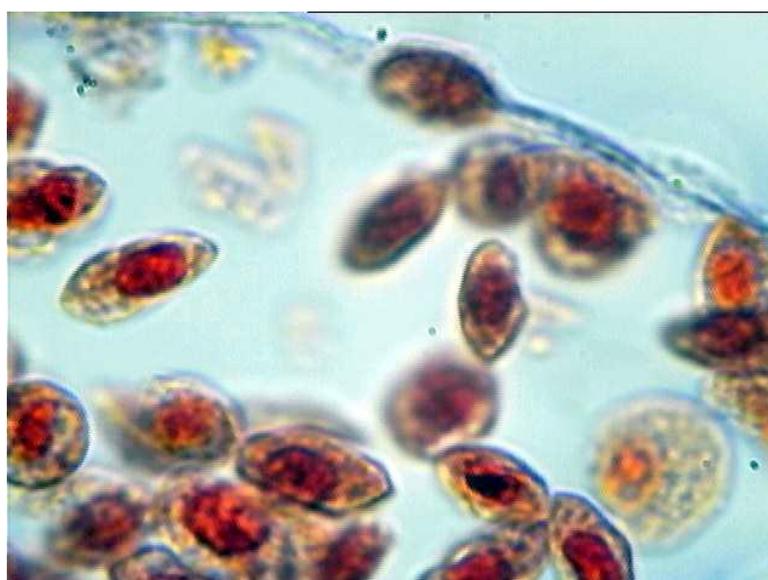


Рисунок 10. Типичные клетки крови на 15 сутки внутриутробного развития.

Увеличение 1200X. Окраска азаном по Маллори.

4. Фаза вторичной дифференциации зародыша или органогенез. Распространяется на отрезок зародышевого развития примерно с 15-16-х до 34-35-х суток. В течение этой фазы, особенно к концу ее, появляются разнообразные признаки организации, типичные для высших млекопитающих, закладывается вторичная почка, разделяется вертикальной перегородкой желудочковый отдел сердца, редуцируется жаберный круг кровообращения, закладывается селезенка и поджелудочная железа (рис. 11, 12, 13).

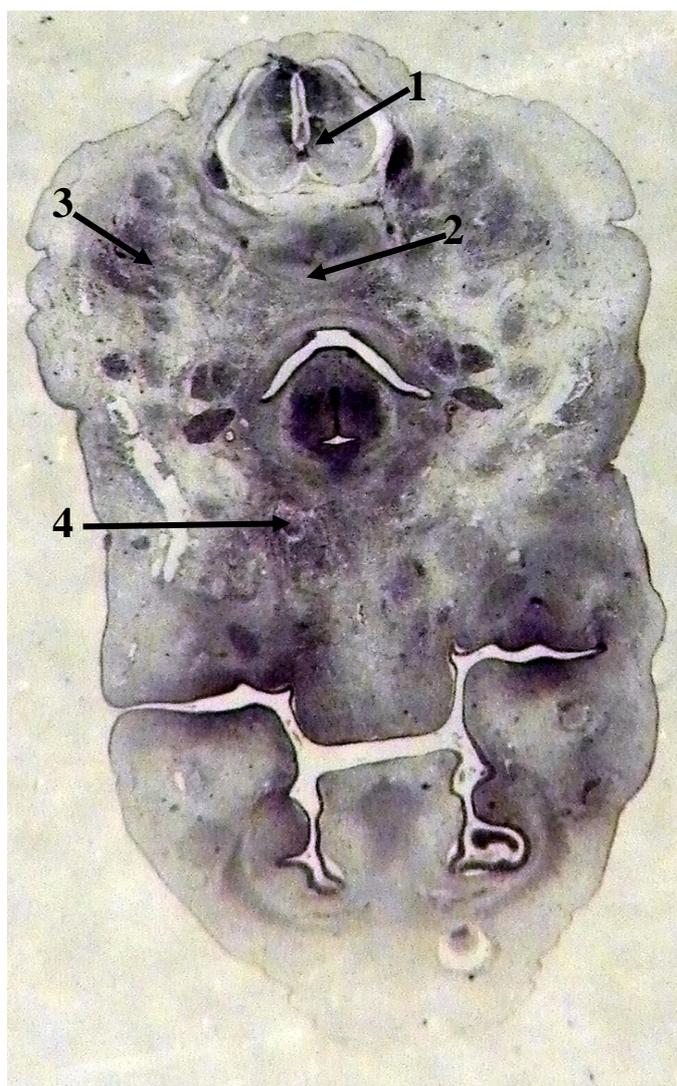


Рисунок 11. Фаза вторичной дифференциации зародыша свиньи на 25 сутки внутриутробного развития. Окраска гематоксилином эозином. Увеличение 10X .

На фронтальном срезе выявляется формирование:

1- спинного мозга,

2- хорды,

3- дифференциация сомитов мезодермы,

4- АГМ- область (место формирования кровяных островков).

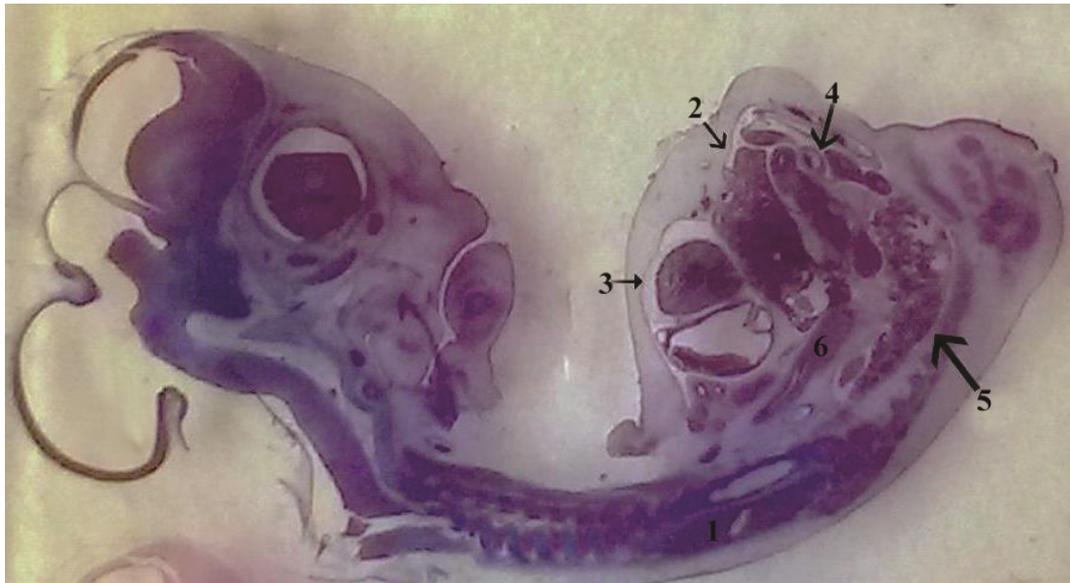


Рисунок 12. Внутренние органы на сагиттальном разрезе эмбриона свиньи длиной на 25 сутки внутриутробного развития). Окраска азаном по Маллори.

Увеличение 40X

1- позвоночник, 2- печень, 3 - сердце,

4 – петля средней кишки /hernia umbilicalis/, 5- первичная почка, 6 – легкое.

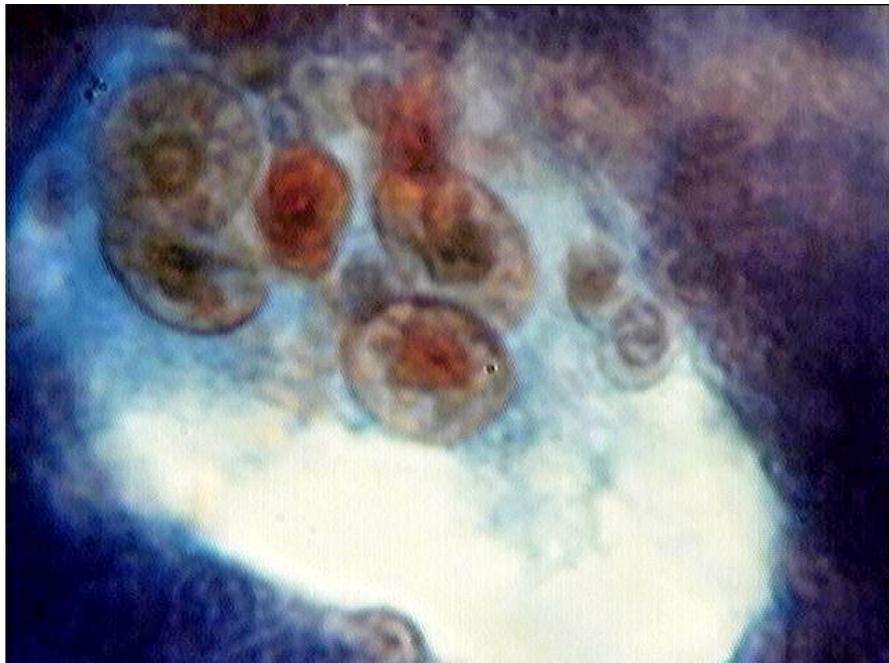


Рисунок 13. Типичные клетки крови на 25 сутки внутриутробного развития.

Окраска азаном по Маллори. Увеличение 1200X.

5. Фаза перехода от зародышевого к плодному периоду. Распространяется на отрезок времени с 35-х по 45-й день супоросности. К концу этой фазы появляются признаки, специфические для данного вида животных. Формируется хрящевой скелет и начинаются процессы окостенения, завершается формирование мускулатуры стенок тела, определяется пол и т.д. К этому времени определяется дифференциация центральной и периферической нервной системы. Этой фазой завершается зародышевый период развития свиньи, после чего мы имеем дело уже со сформированным плодом (рис. 14, 15, 16).

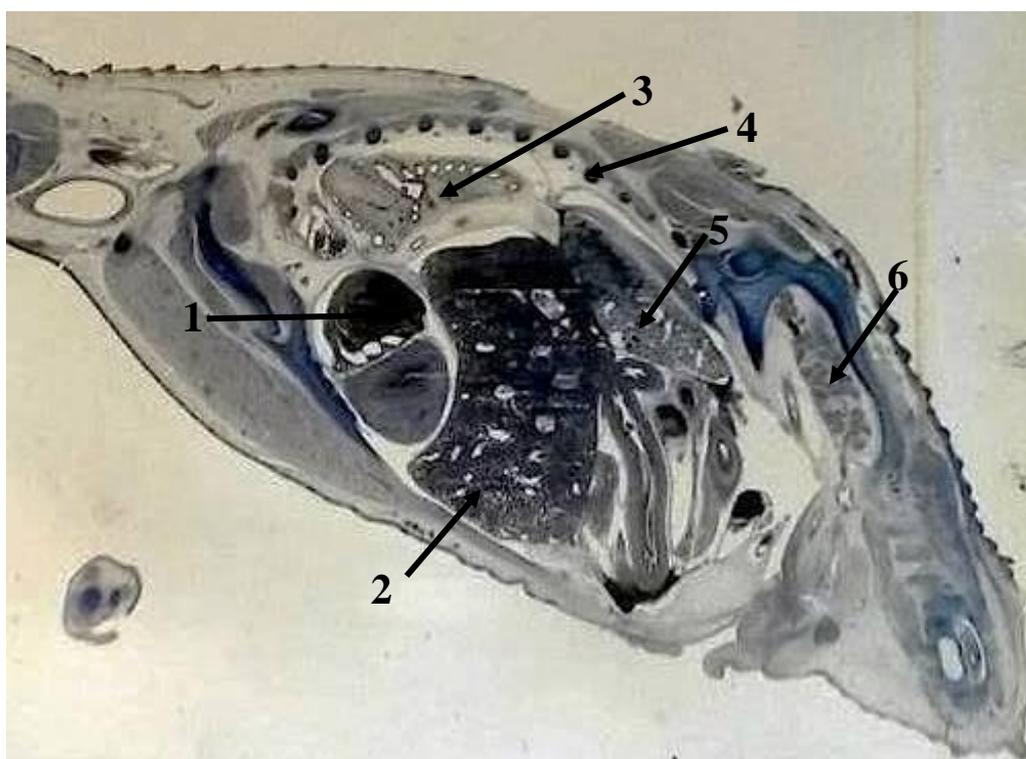


Рисунок 14. Сагитальный срез абдоминальной части зародыша свиньи на 35 сутки внутриутробного развития. Окраска азаном по Гейнденгайну. Увеличение 40X.

- 1- сердце, 2- печень,
3-легкое, 4- позвоночник,
5- селезенка, 6- первичная почка.*

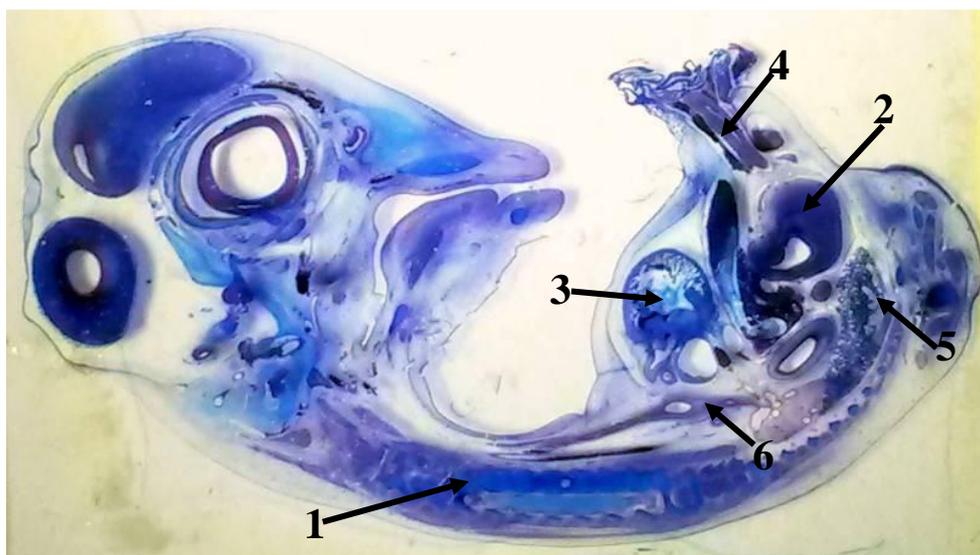


Рисунок 15. Внутренние органы на сагиттальном срезе плода свиньи 35 суток внутриутробного развития. Окраска азаном по Маллори. Увеличение 40X.

*1. место формирования позвоночника, 2- печень, 3 - сердце,
4 – пупочный канатик, 5- первичная почка, 6 – легкое.*

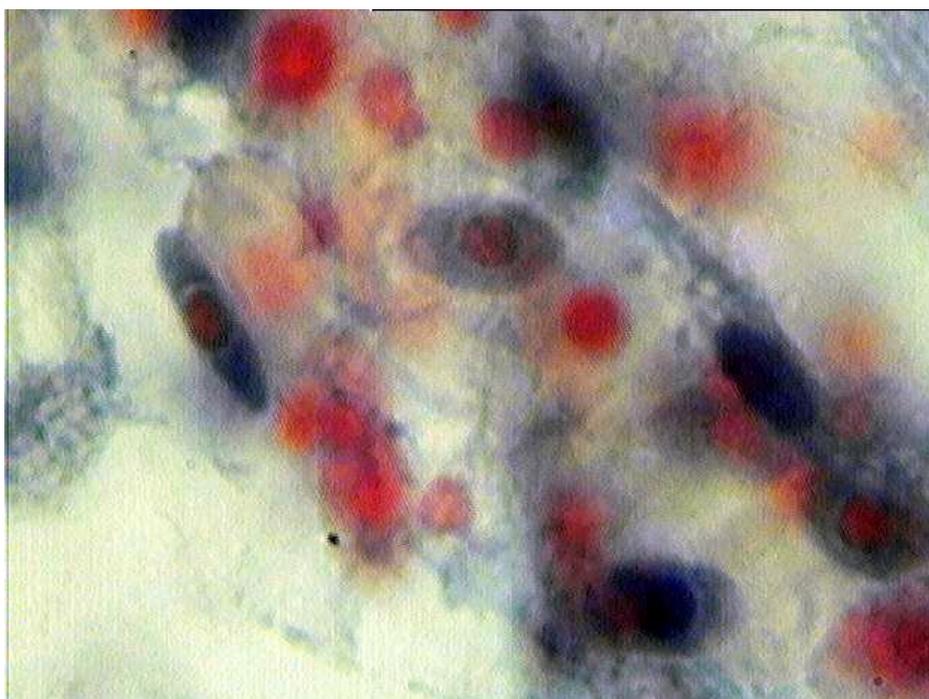


Рисунок 16. Типичные клетки крови на 35 суток внутриутробного развития.

Окраска азаном по Маллори. Увеличение 1200X.

Плодный период распространяется на отрезок внутриутробного развития свиньи от конца зародышевого периода до момента рождения. Этот период характеризуется дальнейшей дифференцировкой внутренних органов плода и его тканей, завершается формирование структур, определяющих его жизнеспособность во внеутробной жизни, т.е. способность к дыханию, пищеварению, движения, терморегуляции, функциональной деятельности органов чувств и эндокринных органов.

Гистологические исследования внутренних органов плодов свиньи, позволяют предположить наличие 2 фаз в развитии плода свиньи:

1. Фаза начала функциональной деятельности большинства тканей и внутренних органов плода, распространяется на отрезок времени с 45-го по 65-й день супоросности. Ткани и внутренние органы свиньи в течение этой фазы приобретают ту специфичность в своих функциях, которая присуща им в постэмбриональный период (рис.17, 18).

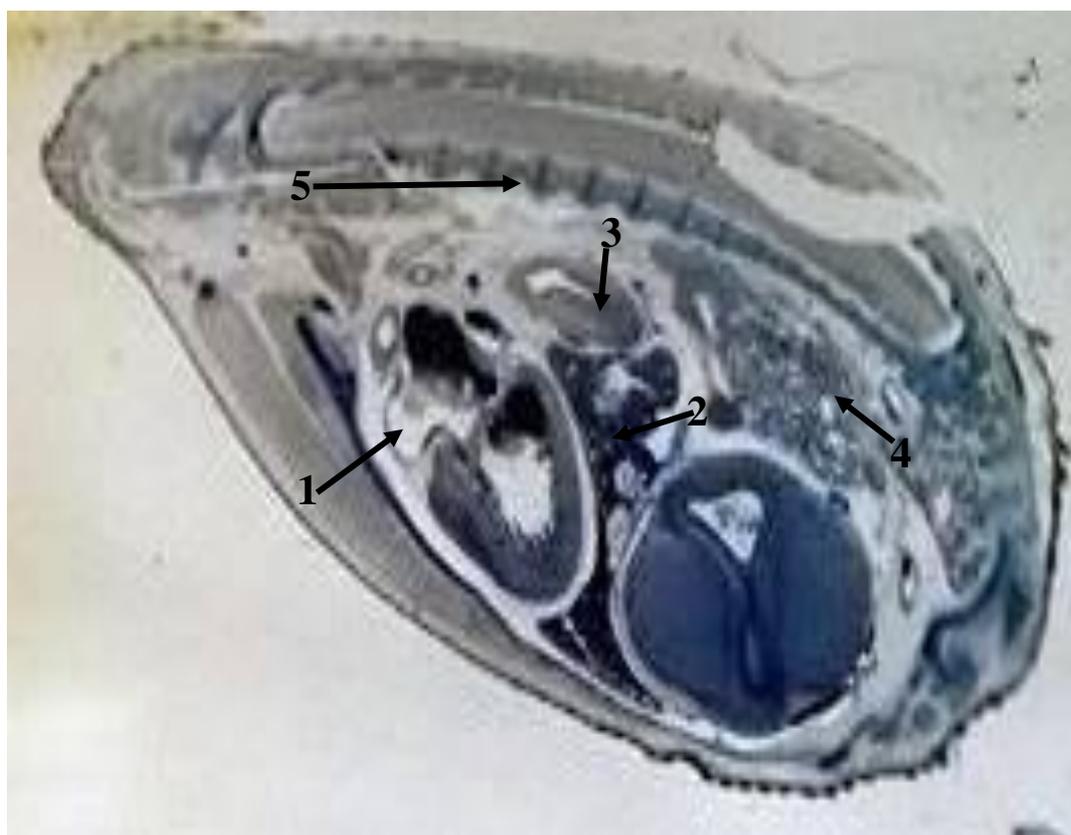


Рисунок 17. Сагитальный срез абдоминальной части плода свиньи на 45 сутки внутриутробного развития. Окраска азаном по Гейнденгайну. Увеличение 40X.

- 1- сердце, 2- печень,
- 3- легкое, 4- вторичная почка,
- 5- позвоночник.

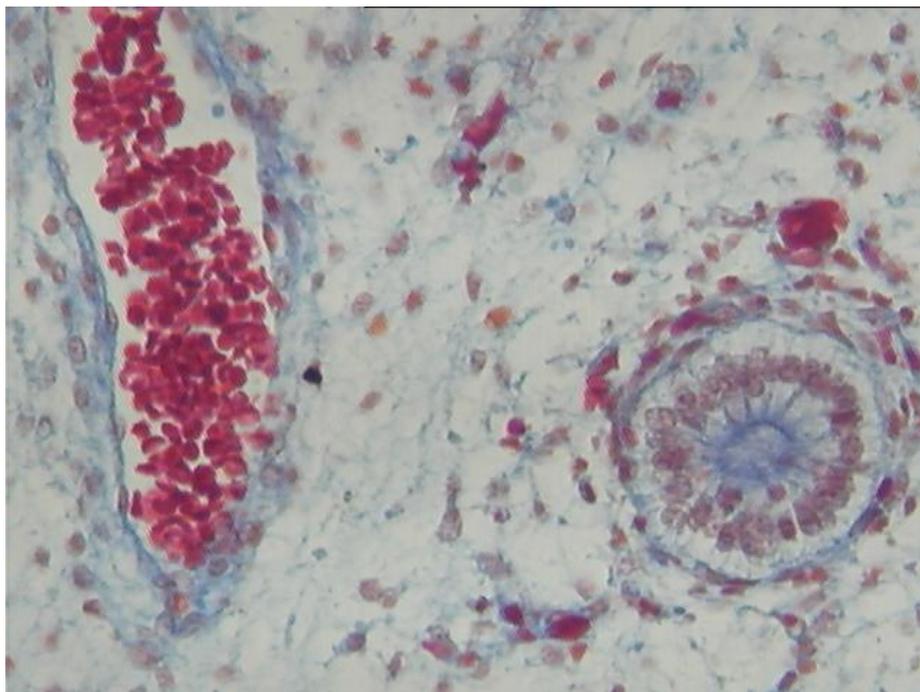


Рисунок 18. Типичные клетки крови на 45 сутки внутриутробного развития.
Окраска азаном по Гейденгайну. Увеличение 250X.

2. Фаза интенсивного абсолютного роста плода и дальнейшей специализации функций, распространяется на отрезок с 65-го дня супоросности до момента рождения. Наиболее характерной чертой для данной фазы развития плода является интенсивное увеличение его абсолютных размеров и веса, нарастание массы тела, быстрый процесс окостенения, специализация, усложнение и утончение функций нервной системы, а также и других систем в результате чего, формируется жизнеспособный, в значительной степени приспособленный к самостоятельному образу жизни и функционально независимый к моменту рождения организм.

Проявление фазности, периодичности или стадийности в развитии живых индивидуумов выражает общебиологическую закономерность, присущую всем без исключения организмам. Эти стадии являются теми необходимыми этапами смены и усложнения функций, на основе которых происходит развитие форм тканей и органов животных. Прохождение отдельных фаз и периодов, как мы видим, идет в определенной последовательности смены форм и их функций, а также усложнения биохимических и физиологических процессов. Предложенная выше система периодизации внутриутробного развития свиньи не является полноценной, проведена нами в связи с исследованиями всех

крововетворных органов, которые мы провели при изучении эритропоэза на всех этапах эмбрионального развития свиньи. Подробный анализ всех эритроидных клеток и их физиологические показатели будут подробно рассмотрены в главах.

3.2. Эмбриональное развитие сердечно-сосудистой системы

Нами было выявлено, что уже на ранних стадиях развития эмбриона свиньи происходит расщепление латеральных частей мезодермы на два слоя: наружный и внутренний, которые дают начало образованию целома. В начале внутризародышевый целом образуется, начиная с 10-х до 15-х суток в том месте, где находится сердце, что повидимому, обуславливает формирование сердечно-сосудистой системы в целом. Ранняя дифференциация сердечно-сосудистой системы является специфической чертой развития высших млекопитающих, определенно коррелирующей с необходимыми условиями роста и развития зародыша. В процессе развития происходит подгибание тела эмбриона сначала в передней его половине, а затем в задней. При этом так называемое первичное сердце, являясь непарным органом у взрослых форм, в это время представляет собою парное трубчатое образование. В последствие, парные кардиальные трубки сближаются, сливаясь образуют непарное трубковидное сердце (рис. 19).

Важно отметить, что на это время приходится и начало формирования первых эритроидных клеток в интраэмбриональной мезенхиме зародыша и кровяные островки длительное время не имеют сосудистой стенки, т.о. на первых порах, стенка новообразующихся сосудов не сплошная. Возникшие первичные сосуды, представляют собой тонкостенные трубочки, содержащие первичную кровь. Таким образом, появляются главные кровеносные пути, характерные для зародышей на этой фазе развития. Кроме сосудов, распределенных внутри тела зародыша, появляются крупные сосуды, выходящие за пределы его к желточному мешку.

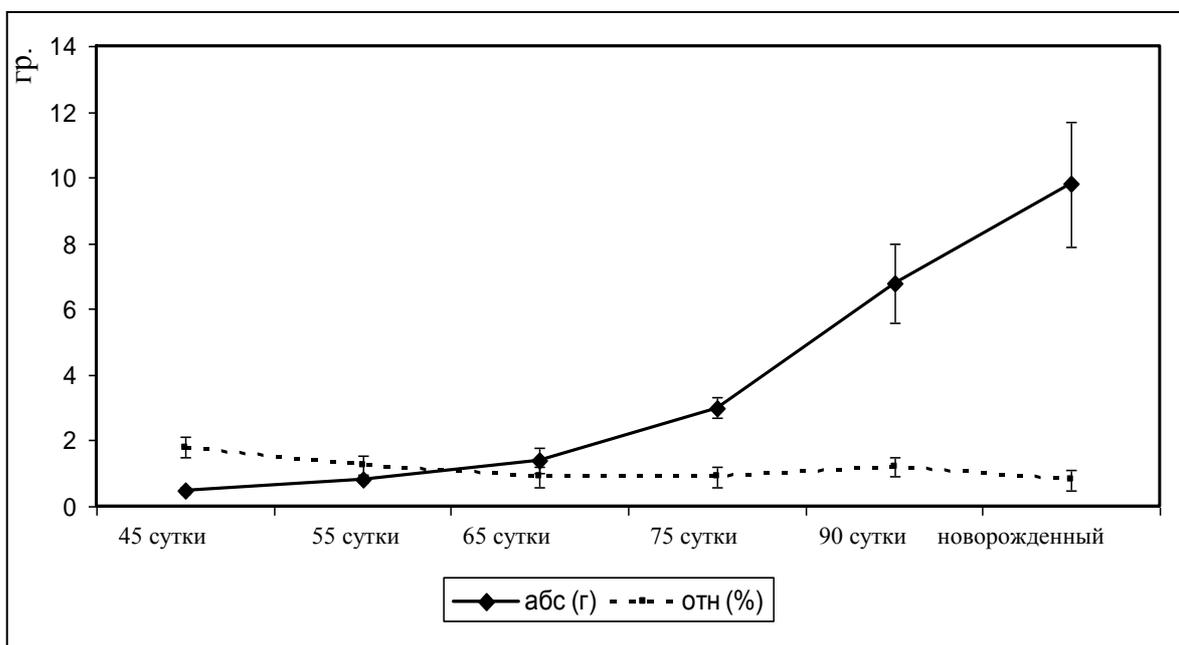
Известно, что сердце относится к числу тех немногих внутренних органов, развивающегося в утробе организма, деятельность которого в эмбриональный период почти ничем не отличается от деятельности в постнатальный период жизни. Кровообращение обеспечивает возможность осуществления обмена веществ между органами плода и материнским организмом.



Рисунок 19. Сердце 15 дневного эмбриона свиньи, сагиттальный срез.
Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение 40X.

График 3.

**Динамика абсолютного и относительного веса сердца свиньи
в эмбриональном и неонатальном периоде**



По оси абсцисс- возраст эмбриона (сут.)

По оси ординат- вес эмбриона (гр.)

Более того, мы можем твердо сказать, что сложнейшие и интенсивнейшие процессы дифференциации и роста, свойственные зародышу, протекают в условиях обильного

снабжения питательными веществами и кислородом посредством развитой системы кровообращения.

Данные взвешиваний говорят об интенсивном нарастании массы сердца за период плодного развития. За это время сердце увеличивает свой вес более, чем в 21 раз. Однако, несмотря на столь интенсивное нарастание абсолютного веса, относительный вес его падает, уменьшаясь за этот же период примерно в 2 раза. Относительная интенсивность роста также снижается, повторяя в общих чертах кривую падения относительного веса (граф. 3).

На сагитальном срезе 25 суточного зародыша свиньи видно относительно большой величины сердце (рис. 20), которое занимает большую часть грудной клетки. Оно имеет форму конусообразного мешка и уже намечаются неполные межпредсердные и межжелудочковые перегородки. Кровеносная система, заложенная еще у 15 суточного зародыша, представлена сложной, хорошо разветвленной сетью сосудов, заполненных ядерными эритроидными клетками.



Рисунок 20. Сердце 25 дневного эмбриона свиньи.
Окраска азаном по Маллори. Увеличение 15X.

3.3. Мезенхимальный эритропоэз в эмбриогенезе свиньи.

Исследования мезенхимального интраэмбрионального эритропоэза показали, что у 15-и суточного зародыша свиней, длина которого колеблется от 3,0-х до 6,0-и мм ($4,5 \pm 1,5$), а вес от 2,5 до 5,5 мг ($4 \pm 1,5$), и который уже имеет в среднем 6 пар сомитов, наблюдается дифференцировка мезодермы на внутри- и внезародышевую мезодерму. Последняя идет на образование защитных и трофических оболочек зародыша, а внутрizarодышевая мезодерма дает начало первичной полоске, на краниальном конце которой возникают зачатки головного

мозга и глаз. В мезенхиме перикардиальной области видны вкрапления эритроидных клеток. Важно заметить также, что на первом этапе эмбриогенеза отмечается односторонняя направленность дифференцировки стволовых клеток в сторону эритропоэза [Kyunghhee C., 2002; Zambidis T. et al., 2005; Tada T. et al., 2006, Isern J. et al., 2008]. Эти очаги эритропоэза хорошо заметны у 15 и 25 дневного эмбриона свиньи (рис. 21), но практически полностью исчезают у 35 дневного зародыша (у последних заметны единичные, зачастую единственные очаги в AGM- области).

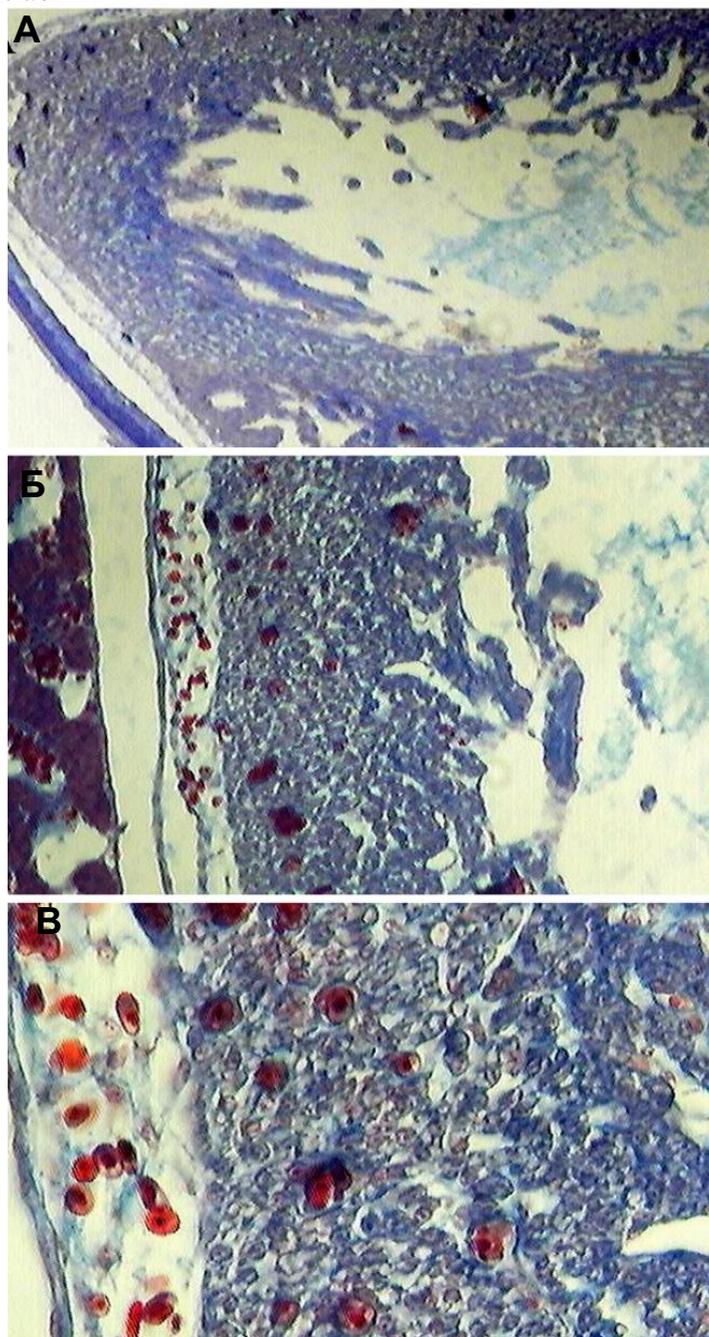


Рисунок 21. Общий вид множественных очагов первичного эритропоэза в прекардиальной области 25 суточного эмбриона.

Окраска азаном по Маллори. Увеличение А- 40Х; Б - 100Х; В - 250Х.

В структуре мезенхимального кровяного островка у 15-и дневного эмбриона свиньи хорошо видны эритроидные клетки крови, которые принято называть гемангиобластами (рис.22). Почти все они содержат ядра и находятся на разных стадиях дифференцировки. Среди них есть как малодифференцированные, так и более продвинутые в дифференцировке бластные формы, а также ядерные формы примитивных эритроцитов.

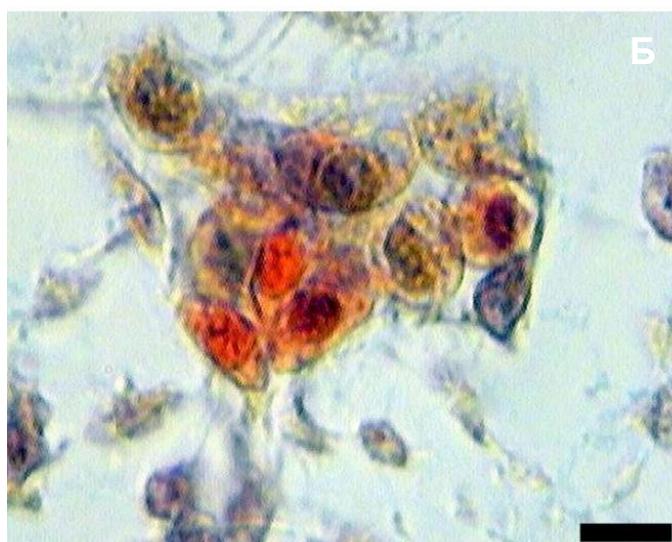
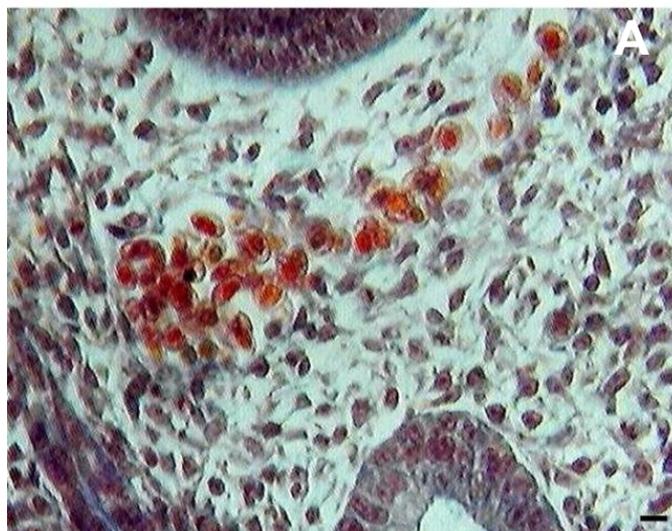


Рисунок 22. Первичный примитивный эритропоэз в прекардиальной области 15 суточного эмбриона свиньи. Окраска гематоксилин-эозином по Карачи (А) и азаном по Гейденгайну (Б). Шкала 10µm.

Популяционный состав представлен следующим образом, подавляющее число (около 63%) составляют гемангиобласты, и 37% приходится на первичные эритроциты (табл. 5). Из 37% первичных эритроцитов в популяции 15 дневных зародышей 28% приходится на крупные эритроциты и 9% на более мелкие. Обе популяции эритроидных клеток отличаются и по размерам. При этом, площадь ядер мелких и крупных эритробластов, а также

примитивных эритроцитов незначительно отличаются как друг от друга, так и между собой. В то же время площадь цитоплазмы крупных мегалобластов и первичных эритроцитов достоверно больше их мелких аналогов, но различия в площади цитоплазмы и клеток в целом между эритроблантами и эритроцитами незначительна.

Данные, полученные нами по динамике изменения содержания гемоглобина в мезенхимальных эритроидных клетках выявили, что наибольшее содержание гемоглобина приходится на 15-е сутки эмбриогенеза. При этом, как ранее нами было показано, число бластных форм в среднем в два раза больше количества эритроцитов, но содержание гемоглобина в них примерно одно и то же (табл. 6). Важно заметить, что при этом подавляющее число составляют крупные эритроидные клетки, в которых количество гемоглобина превосходит количество гемоглобина в мелких их аналогах.

Таблица 5.

**Популяционный анализ изменения площади ядер, цитоплазмы и
ядерно-цитоплазменных отношений (μm^2) эритробластов и эритроцитов
15-и дневных зародышей свиньи (M \pm SD).**

Типы клеток	%	Клетки	Ядро	Цитоплазма	Ядерно/цитопл. отношения
Бласты					
Мелкие	5	54.6 \pm 2.4	18.0 \pm 4.0	36.6 \pm 1.9	0.5
Крупные	58	83.3 \pm 5.2	22.9 \pm 4.1	60.4 \pm 3.2*	0.4
<i>Усредненный показатель</i>	63	80.8 \pm 15.8	22.5 \pm 4.1	58.3 \pm 13.5	0.4
Эритроциты					
Мелкие	9	54.1 \pm 4.3.	15.2 \pm 2.6	38.9 \pm 2.7	0.4
Крупные	28	86.1 \pm 8.1	23.2 \pm 4.0	62.9 \pm 6.7*	0.4
<i>Усредненный показатель</i>	37	82.6 \pm 21.0	22.4 \pm 5.2	60.2 \pm 17.9	0.4

*Примечание: *достоверно ($p < 0,05$) по сравнению с мелкими клетками (применялся метод достоверности по статистическому критерию t-Student)*

Таблица 6.

Содержание гемоглобина (Hb, пк/г) в мезенхимальных эритроблестах и эритроцитах эмбрионов свиньи на 15-е сутки беременности (M±SD).

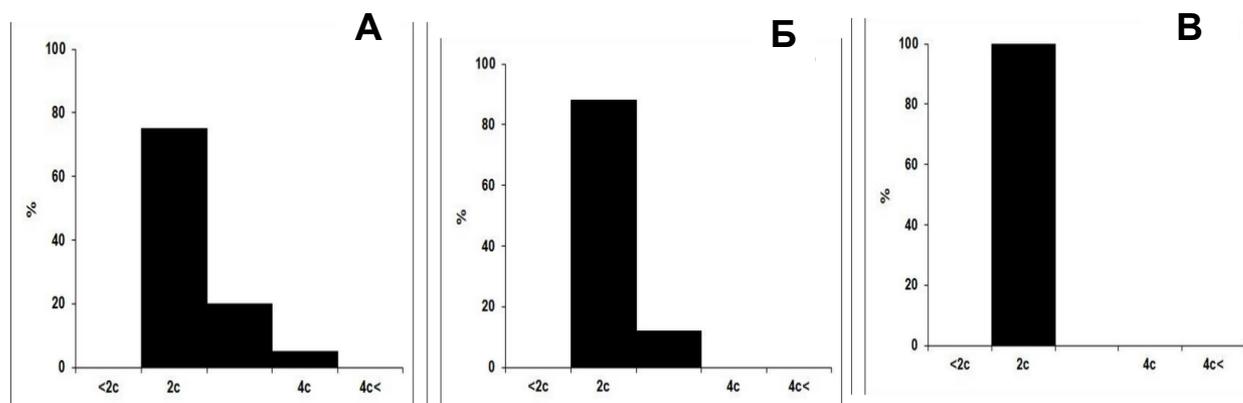
Типы клеток	Бласты		Эритроциты	
	%	Hb	%	Hb
Мелкие	5.0	34.8±0.9	9.0	34.5±1.2
Крупные	58.0	53.1±1.2*	28.0	54.8±2.3*
<i>Усредненный показатель</i>	<i>63.0</i>	<i>51.5±1.7</i>	<i>37.0</i>	<i>52.6±2.3</i>

*Примечание: *достоверно ($p < 0,01$) по сравнению с мелкими клетками (применялся метод достоверности по статистическому критерию t-Student)*

Исследование распределения ядер мезенхимальных эритроидных клеток по классам плоидности (граф. 4) выявило, что основную массу эритроидных клеток на 15-е сутки зародышевого развития поросят (около 80%) составляет диплоидная популяция, число гипердиплоидных клеток не превышает 15%, а количество тетраплоидных клеток незначительно и составляет не более 5% от всей популяции. Уже на 25 сутки развития эмбриона тетраплоидные клетки полностью отсутствуют, а число гипердиплоидных клеток не превышает 10%. На более поздних сроках развития эмбрионов мезенхимальные эритроидные клетки представлены диплоидной популяцией.

График 4.

Распределения ядер мезенхимальных эритроидных клеток по классам плоидности.



A – 15 сутки; B - 25 сутки и V - 35 сутки внутриутробного развития эмбриона.

В виду того, что в доступной литературе данные о примитивном эритропоэзе свиней нами не были обнаружены, мы провели полное исследование первичного внежелточного эритропоэза у свиней (в частности, нами были исследованы дополнительные сроки гестации). Следует отметить, что результаты оказались разноплановыми. Так, на 10 сутки эмбрионального развития эритропоэз в АГМ-области полностью отсутствовал у всех зародышей, а на 13 сутки нами обнаружены кровяные островки (однако, у некоторых эмбрионов эритропоэз отсутствовал). Оказалось, что основная часть мезенхимных клеток развивается в эритробласты. Однако некоторые клетки дифференцируются в мегакариоциты, гранулоциты и фагоцитирующие клетки, аналогичные соответствующим клеткам взрослых. Количество этих клеток невелико, и больших разрастаний клеток крови, подобных кроветворным островкам желточного мешка, в мезенхиме полости тела не формируется.

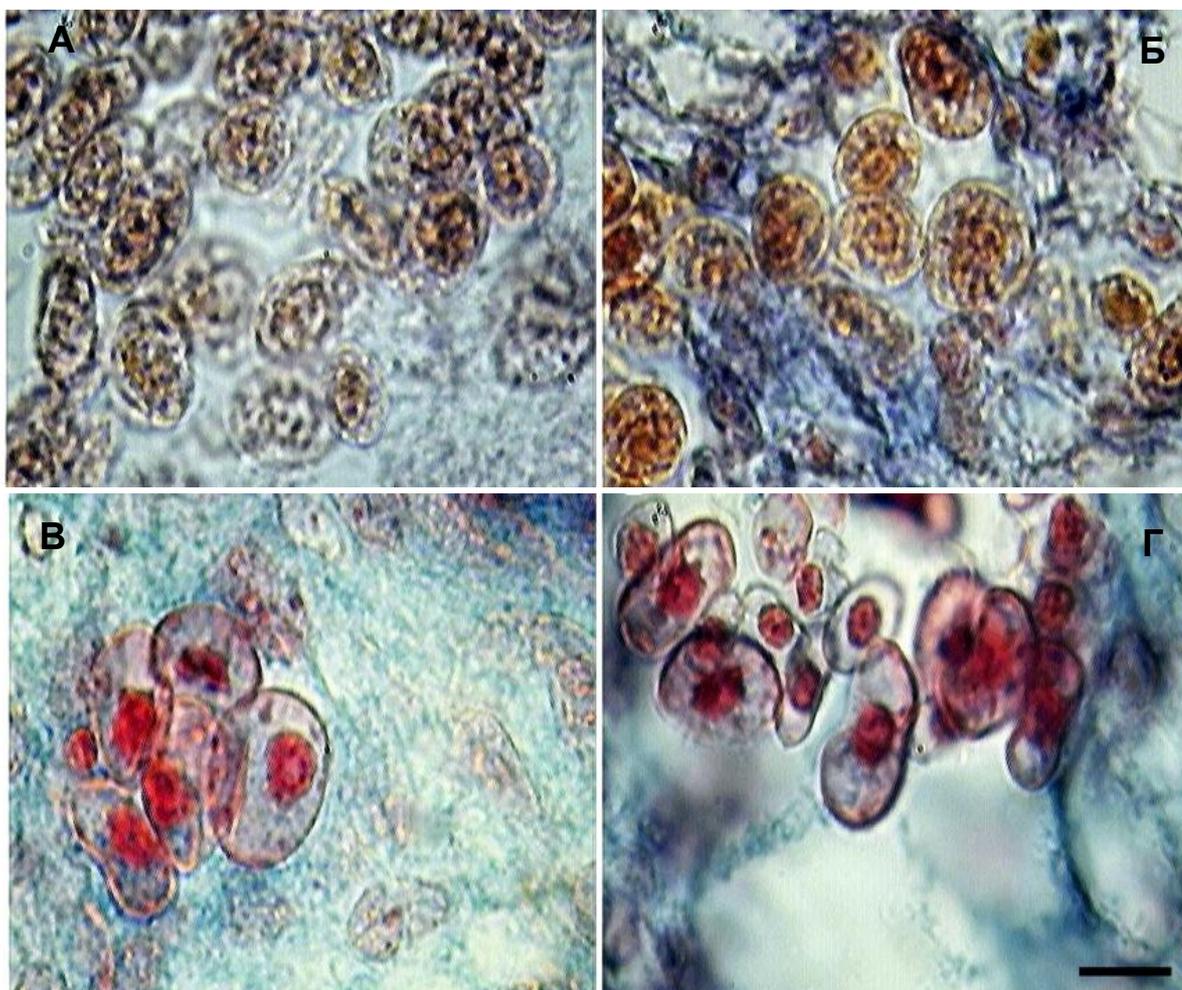


Рисунок 23. Клетки первичного примитивного эритропоэза в прекардиальной области 25 суточного эмбриона. А, Б, - окраска гематоксилин-эозином по Карачи, В, Г – окраска азаном по Маллори. Шкала 10µm.

Стволовые клетки, располагающиеся среди этих гемопоэтических клеток (вне желточного мешка), вероятно, играют главную роль в генерации последующих поколений гемопоэтических клеток у плода и в постнатальном периоде, хотя относительный вклад первичных стволовых клеток, находящихся в желточном мешке и вне его, в более поздний гемопоэз пока не ясен.

Надо заметить, что у свиней кроветворение в эмбриональной мезенхиме полости тела напоминает кроветворные островки желточного мешка, только меньшего размера, и соответственно содержат меньшее число клеток. Эти образования выявляются только в периоде 15-25 дневного эмбриона и практически полностью отсутствуют на более поздних сроках (рис. 23, 24).

На рисунке хорошо видны как крупные эритроидные клетки на разных стадиях дифференцировки, так и мелкие первичные эритроциты. Изредка встречаются безъядерные клетки.

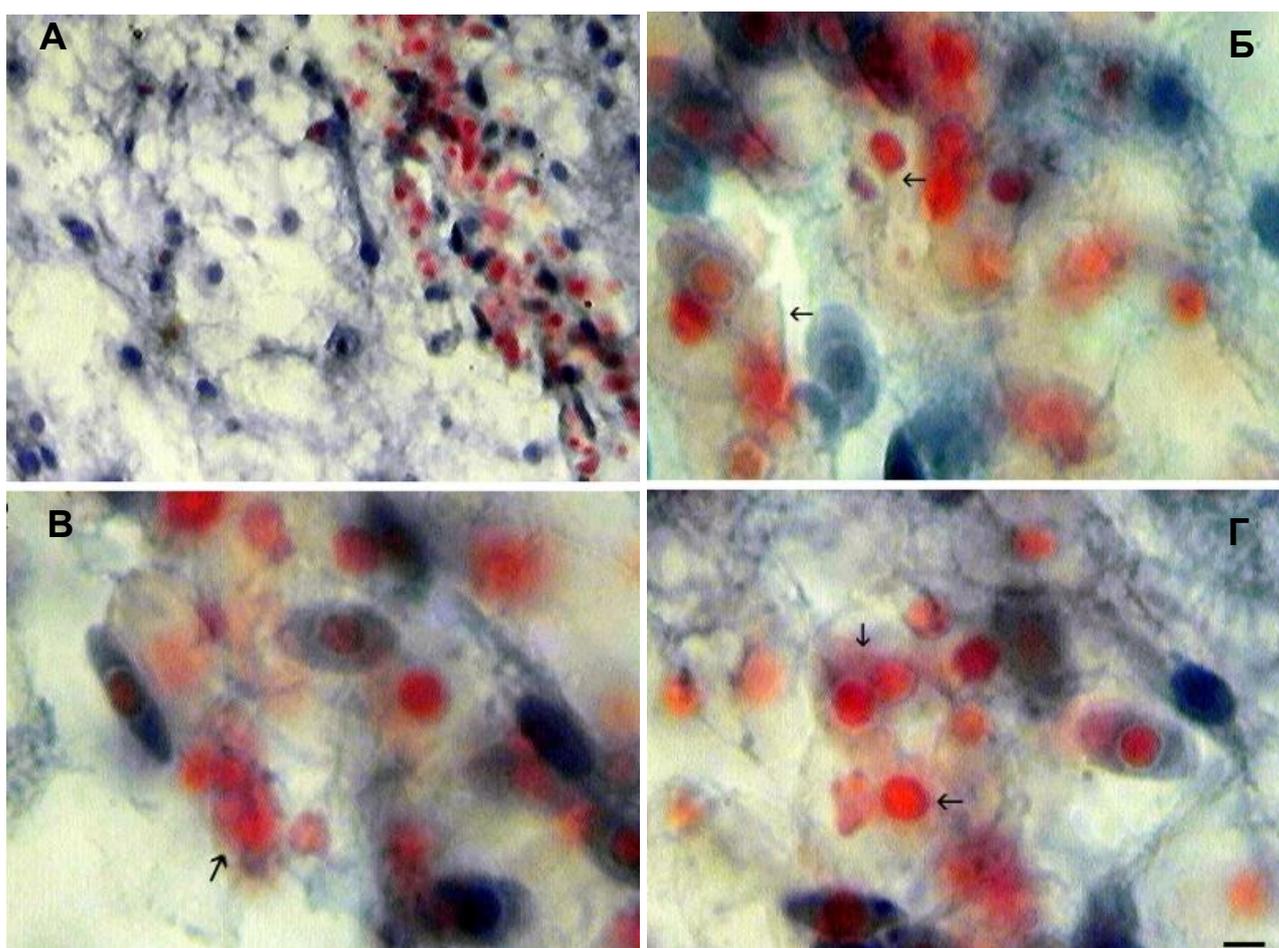


Рисунок 24. Последние очаги первичного примитивного эритропоэза в прекардиальной области 35 суточного эмбриона.

Окраска азаном по Маллори. Шкала А - 40 μm ; Б; В; Г. 10 μm .

При этом важно заметить, что по мере увеличения возраста эмбриона наблюдается та же тенденция к увеличению числа мелких эритроцитов, что вероятно связано с затуханием по мере развития эмбриона ангиобластического периода кроветворения. На 25-е и 35-е сутки нами были обнаружены в небольшом количестве безъядерные клетки крови, которые мы не учитывали.

Сравнение популяционного состава и площади эритроидных клеток мезенхимального кроветворения и кроветворения в желточном мешке выявило, что с увеличением возраста эмбриона содержание гемоглобина в клетках имеет не выраженную тенденцию к снижению, в то время как уже на 25-е и 35-е сутки содержание гемоглобина достоверно уменьшается (табл. 7).

Таблица 7

Содержание гемоглобина (Hb) в мезенхимальных эритроблестах и эритроцитах эмбриона свиньи (M±SD).

Клетки	15 дневные	25 дневные	35 дневные
Эритробласт	39.4±6.3	35.2±4.4	33.2±3.1
Безъядерный эритроцит	30.7±4.8	28.5±5.0	22.3±2.6*

*Примечание: *p<0.1 тенденция по сравнению с 15 сутками (применялся метод достоверности по статистическому критерию t-Student)*

С точки зрения морфологического анализа, гистологии и цитологии клеток эмбрионального гемопоэза у свиней мы сочли удобным разделить его на следующие отделы: это интраэмбриональная локализации гемопоэтических клеток, которая включает парааортальную мезенхиму и AGM-район (место закладки аорты, гонад и первичных почек - в области мезонефроса). Этот мезенхимальный примитивный эритропоэз у свиней был зафиксирован нами на 13-15 дни гестации, затем, начиная с 15-25 дня гестации, к нему уже присоединяется экстраэмбриональное кроветворение в желточном мешке и носит смешанный характер. В дальнейшем с 25 суток внутриутробного развития начинается кроветворение в печени и селезенке, которое длится вплоть до рождения. Костномозговой гемопоэз начинается на 45 сутки внутриутробного развития и достигает значимых показателей примерно к 65-75 дням гестации.

Таким образом, в отличие от общепринятого описания формирования островков крови, в которой примитивный эритропоэз возникает только внутрисосудисто в желточном мешке, наши данные показывают, что у свиней он начинается и экстраваскулярно. Следовательно, мы можем подтвердить гипотезу о том, что в эмбриогенезе млекопитающих формируется интраэмбриональная зона локализации гемопоэтических клеток, которая включает парааортальную мезенхиму и AGM-область [Bruijn M. et al, 2000; Nishikawa M. et al, 2001; Robin C. et al, 2003; Huber T. et al., 2004; Mikkola H.K., Orkin S.H., 2006].

3.4 Эмбриональный гемопоэз в желточном мешке. Кровяные островки

Как было показано выше, первые клетки крови образуются в теле зародыша, в местах небольших скоплений мезенхимальных клеток. Но уже, начиная с 15-20-х суток внутриутробного развития, начинается экстраэмбриональное кроветворение в желточном мешке, где клетки крови образуют так называемые кровяные островки. Кровяные островки долгое время считались первым очагом гемопоэза и ангиогенеза у зародышей млекопитающих [Ferkowicz M.J., Yoder M.C., 2005].

Кровяные островки желточного мешка образуются, когда в мезенхиме стенки желточного мешка клетки дифференцируются на плоские (эндотелиальные) и округлые клетки. Плоские клетки, располагающиеся по периферии кровяных островков, теряют связь с клетками, располагающимися в его центре и превращаются в эндотелиальные клетки. А округлые клетки, расположенные в центре кровяного островка, превращаются в стволовые клетки крови (рис. 25).

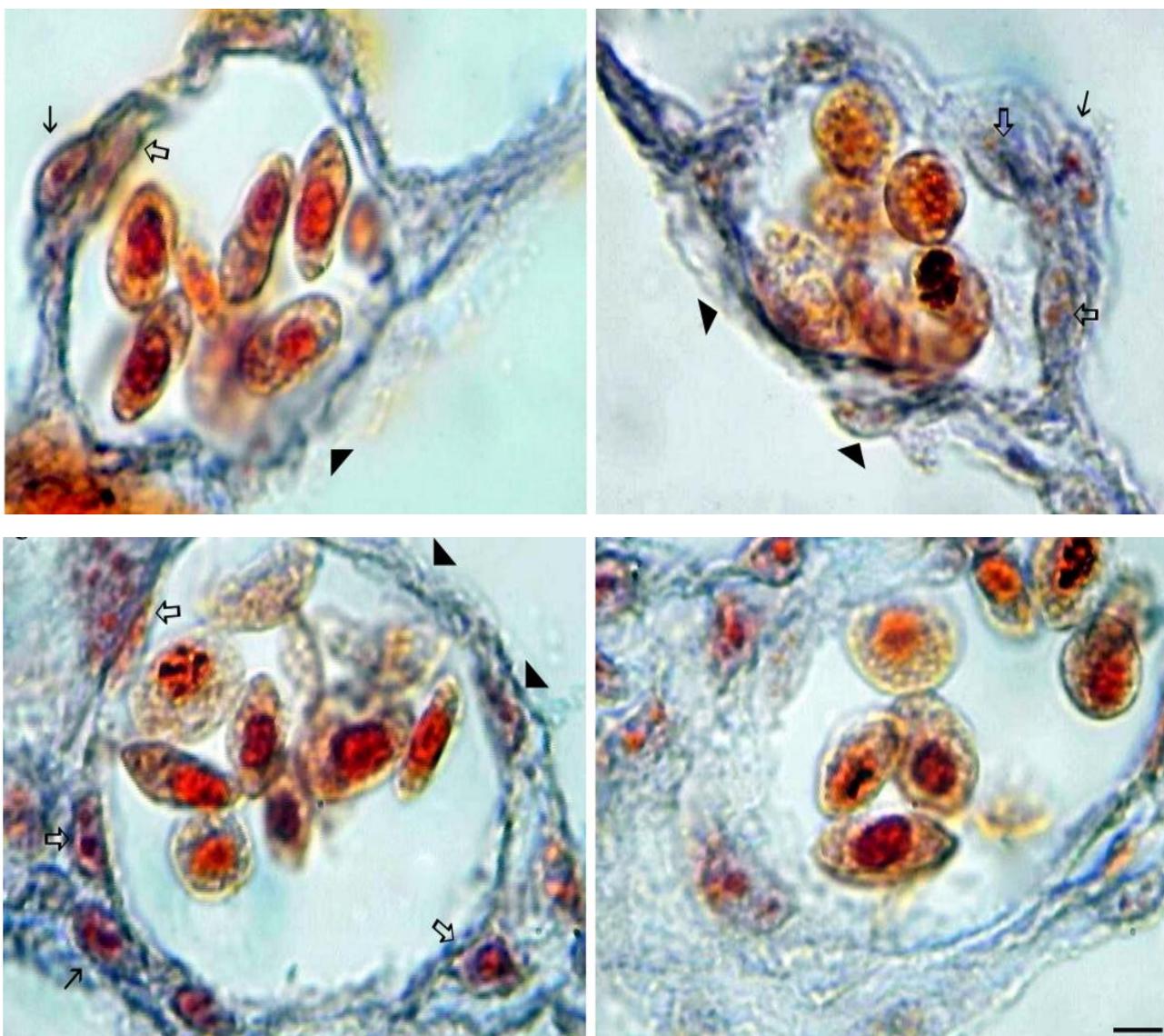


Рисунок 25. Прimitивный кровяной островок в желточном мешке, 15-е сутки внутриутробного развития эмбриона свиньи. Выявляются примитивные эритроидные клетки, окруженные эндотелием (прозрачные стрелки), расположенные между энтодермой (черные стрелки) и мезотелиальными клетками (треугольники).

Окраска азаном по Маллори. Шкала 10 μm

При внезародышевом кроветворении из стволовых клеток формируются первичные эритробласты–мегалобласты, при этом в течение нескольких часов происходит интраваскулярное (внутри сосудистого русла) деление и дифференцировка мезобластов желточного мешка до первичных эритроцитов (рис. 26). На этих же сроках, в основном, на 25 сутки развития эмбриона свиньи происходит и экстраваскулярная дифференцировка первичных лейкоцитов (гранулоцитов, нейтрофилов и эозинофилов).

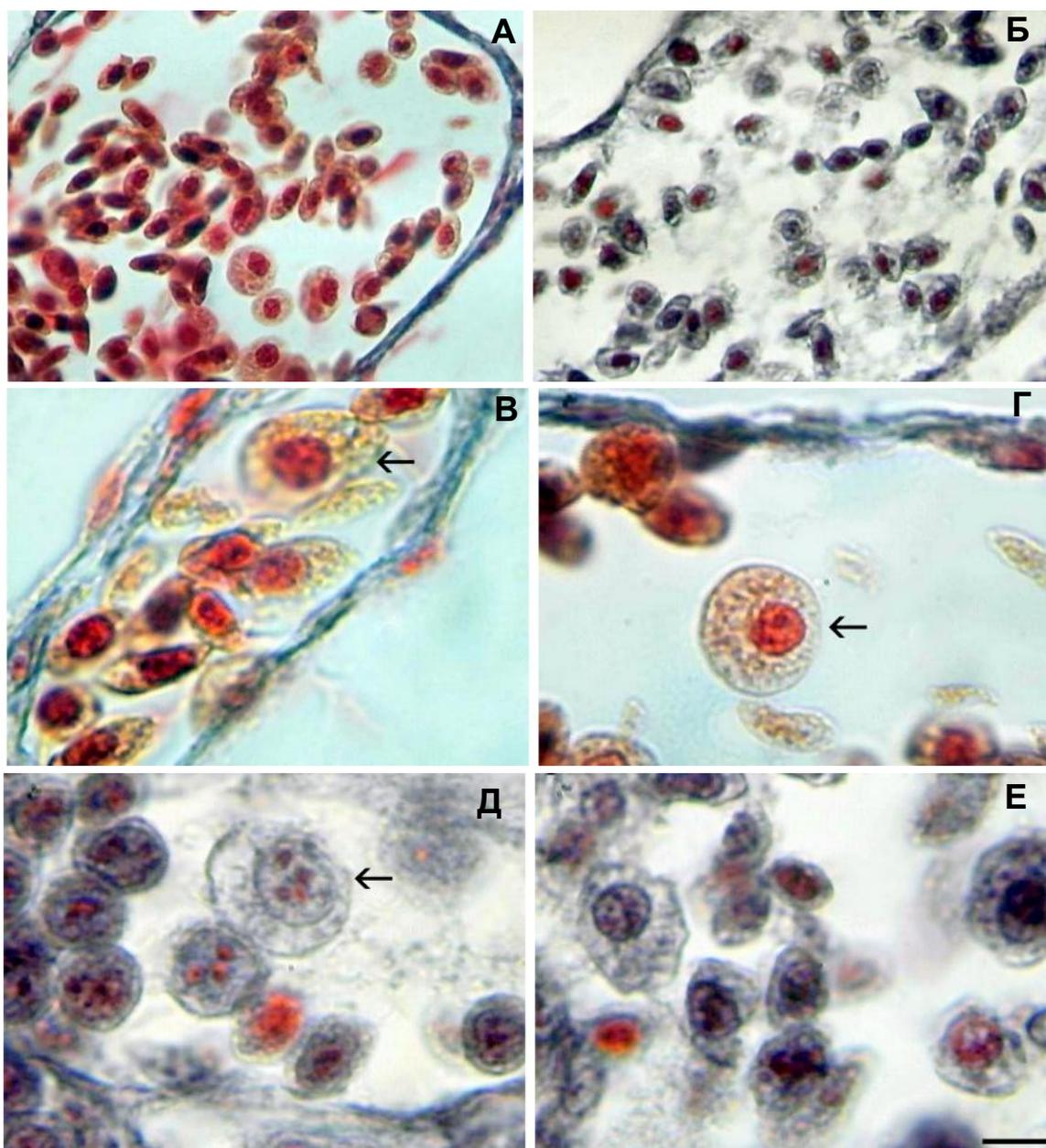


Рисунок 26. Прimitивные эритроидные клетки, 15-е сутки, продольный срез сосудов желточного мешка. Выявляются делящиеся клетки, тетраплоидные клетки (показаны черными стрелками) намного крупнее диплоидных. Окраска по Маллори (А, В, Г) и по Гейденгайну (Б, Д, Е). Шкала А, Б - 20 μm , В, Г, Д, Е - 10 μm .

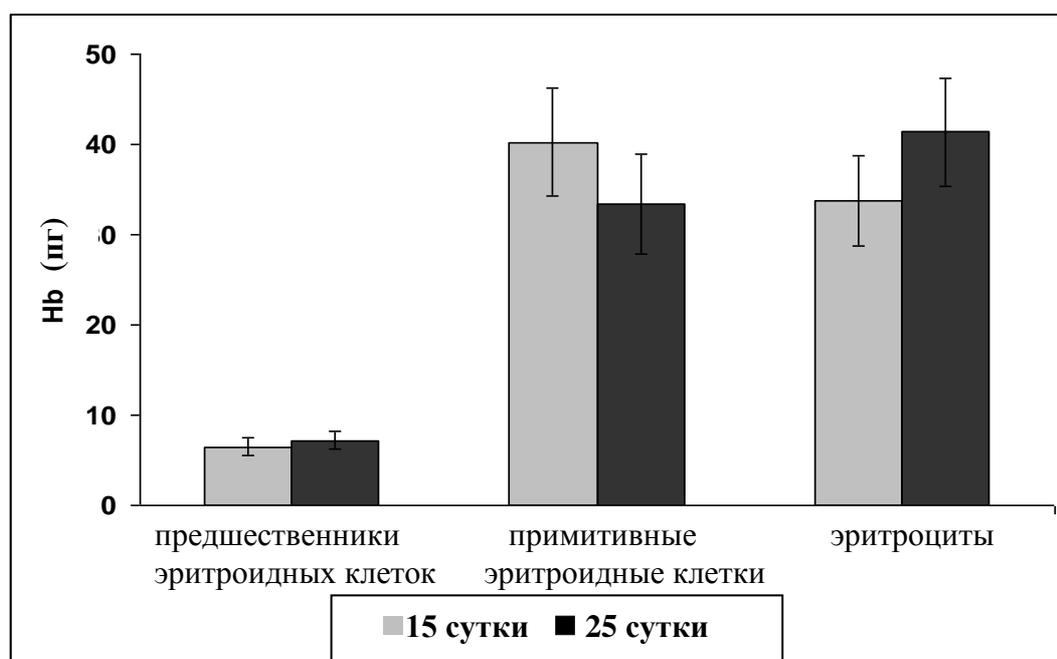
Большинство эритроидных клеток содержат ядра, хотя некоторые из них их не имеют, но все они синтезируют гемоглобин, что обуславливает красноватый цвет хорошо различимых кровяных островков желточного мешка.

Как следует из графика 5 разница в содержании гемоглобина в примитивных эритроидных клетках и у примитивных эритроцитов 15-и, и 25-и дневных зародышей свиньи недостоверна. Однако эти клетки содержат значительно больше гемоглобина ($p < 0.01$), по сравнению с недифференцированными предшественниками эритроидных клеток желточного мешка.

Как видно из графика 6, разница в содержании общего белка в недифференцированных предшественниках гемопоэтических клеток, у примитивных эритроидных клеток и у примитивных эритроцитов желточного мешка недостоверна.

График 5.

Содержание гемоглобина (пг) в эритроидных клетках желточного мешка свиньи в сроки 15 и 25 дневного эмбриона.



Из графика 7, видно, что по мере углубления процессов дифференцировки в эритроидных клетках желточного мешка свиньи происходит снижение содержания РНК. При этом в недифференцированных предшественниках гемопоэтических клеток достоверно больше РНК по сравнению с содержанием РНК у примитивных эритроидных клеток и у примитивных эритроцитов желточного мешка. Важно отметить также, что разница в количестве РНК в исследованных эритроидных клетках на 15-е и 25-е сутки также достоверна. Данный факт хорошо освещен в научной литературе [Van Hove L. et al., 1990].

График 6.

Содержание общего белка (у.е.) в эритроидных клетках желточного мешка 15-и и 25-и
дневного эмбриона свиньи

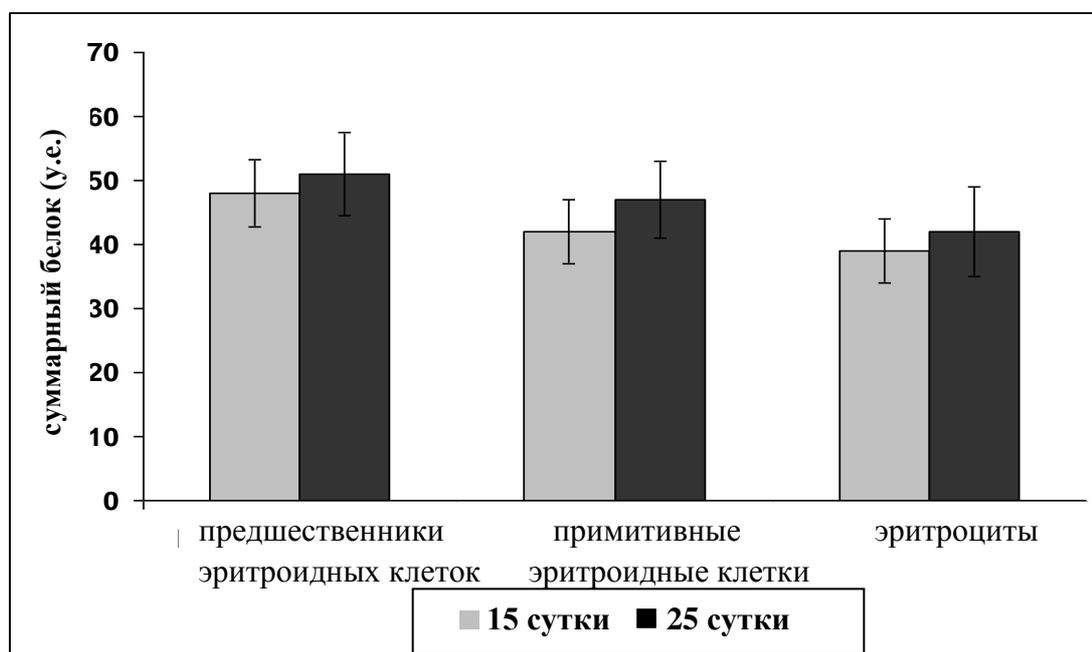
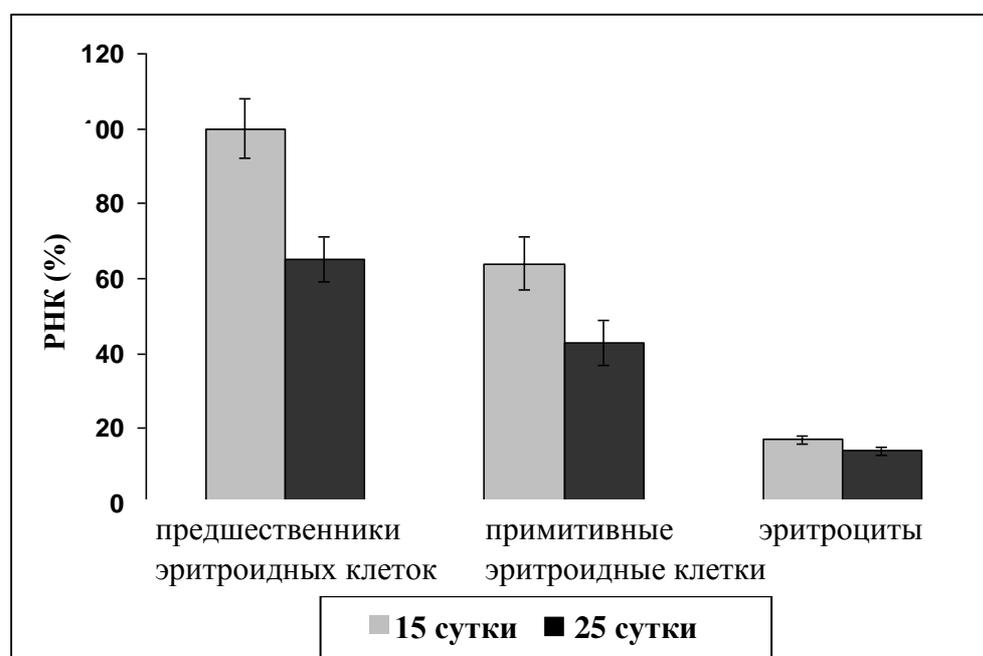


График 7.

Содержание РНК (%) в эритроидных клетках желточного мешка свиньи¹



Примечание: ¹за 100% было принято содержание РНК в предшественниках гемопоэтических клеток 15 дневного эмбриона свиньи

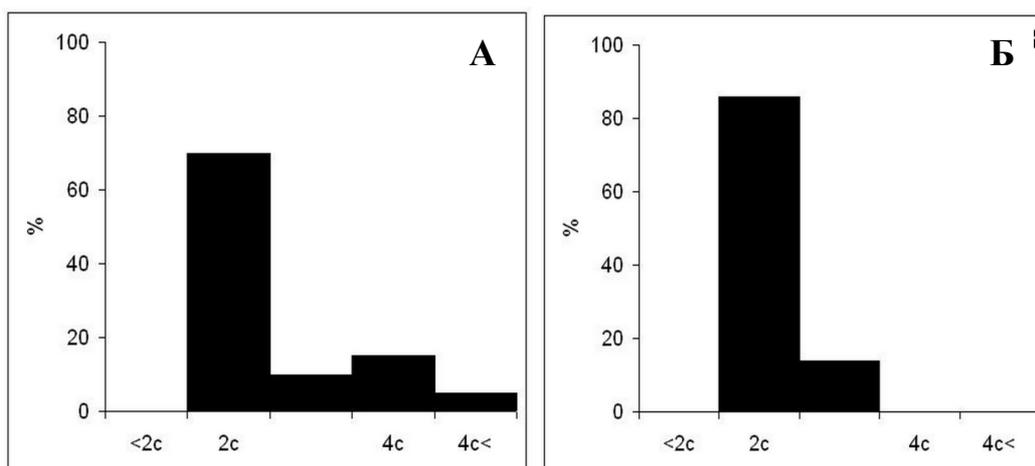
Так, у недифференцированных предшественников гемопоэтических клеток желточного мешка содержится больше РНК, чем у примитивных эритроидных клеток и у примитивных эритроцитов как на 15-е, так и 25-е сутки внутриутробного развития зародыша свиньи ($p < 0.05$), а у примитивных эритроидных клеток больше РНК, чем у примитивных эритроцитов ($p < 0.01$) как на 15, так и 25 сутки внутриутробного развития зародыша свиньи.

Таким образом, в предшественниках гемопоэтических клеток содержание общего белка, в целом, не меньше чем у примитивных эритроидных клетках желточного мешка. Однако количество гемоглобина в ранних клетках значительно меньше (более, чем 3.5-4 раза). Можно полагать, что это объясняется недостаточной дифференцировкой данных клеток. С углублением процессов дифференцировки, начинается ускоренный синтез гемоглобина, который становится основным белком как у примитивных эритроидных клеток, так и у примитивных эритроцитов.

При оценке содержания ДНК в ядрах примитивных эритроидных клеток выявлено, что на 15 сутки внутриутробного развития эмбриона свиньи популяция представлена активно пролиферирующими клетками, о чем свидетельствует наличие гипердиплоидной, тетраплоидной, а также и гипертетраплоидной популяции клеток (граф. 8).

График 8.

Распределение примитивных эритроидных клеток желточного мешка по классам плоидности ДНК на 15 и 25 сутки внутриутробного развития эмбриона свиньи.



А - Примитивные эритроидные клетки на 15 сутки;

Б – Примитивные эритроидные клетки на 25 сутки.

Основная же популяция клеток на 25 сутки эмбрионального развития представлена диплоидными (около 85%) и гипердиплоидными клетками (15%), при этом тетраплоидные клетки исчезают из общей популяции, что свидетельствует о частичном угасании пролиферативной активности.

Полученные нами данные о падении ядерно-плазменных отношений на 35-е сутки до 0.3 связано с уменьшением размеров ядер и также, косвенно свидетельствует о затухании пролиферативной активности эритроидных клеток в данной области. Эти данные хорошо согласуются с результатами исследования содержания ДНК в ядрах эритроидной популяции мезенхимальных островков, которые свидетельствуют, что к 35-м суткам эмбриогенеза вся популяция эритроидных клеток диплоидна, что скорее всего можно объяснить почти полным исчезновением этого очага кроветворения к 35-м суткам внутриутробного развития свиньи.

Согласно нашим данным, кроветворение в кровяных островках является доминирующим типом кроветворения на 15 сутки внутриутробного развития эмбриона свиньи. На 25 сутки примитивный эритропоэз остается значимым (не менее 40%), а на 35 сутки кроветворение в желточном мешке практически исчезает (граф. 9).

На начальном этапе кроветворения у 15-дневных зародышей желточный мешок достигает огромной величины с сильно развитой кровеносной системой. К 25 дню внутриутробного развития эмбриона свиньи, в связи с быстрым увеличением аллантаоиса и аллантаоидного кровообращения, желточный мешок значительно редуцируется. У 35-дневных зародышей желточный мешок сильно сжат и заключен в пуповине.

Интересно, что желточный мешок у зародыша свиньи, как и у всех млекопитающих, потерявший свое значение как депо питательных веществ, благодаря новообразованным сосудам, сохраняет на первых порах внутриутробного развития функцию снабжения питательными веществами развивающегося зародыша. Обильные кровеносные сосуды его, отделенные от стенки матки только тонким внешним слоем трофобласта, легко поглощают питательные вещества, доставляемые организмом матери. Изменения размеров желточного мешка, вероятно, связаны с процессами эритропоэза, который именно к этому времени перемещается в печень.

График 9.

Популяционный состав эритроидных клеток (%) в ранний период эмбрионального развития свиньи



По оси абсцисс – возраст эмбрионов
По оси ординат – популяционный состав эритроидных клеток %

3.5. Эмбриональный эритропоэз в печени свиньи

Начиная примерно с 25 суток внутриутробного развития эмбриона, гемопоэз постепенно перемещается в печень. Печень со временем становится основным кроветворным органом и является активной в этом отношении (впрочем, постепенно снижаясь) до момента рождения. На начальном этапе печеночного гемопоэза происходит формирование примитивных эритроидных клеток, которые формируют очаги гемопоэза, аналогичные кровяным островкам желточного мешка (рис. 27).

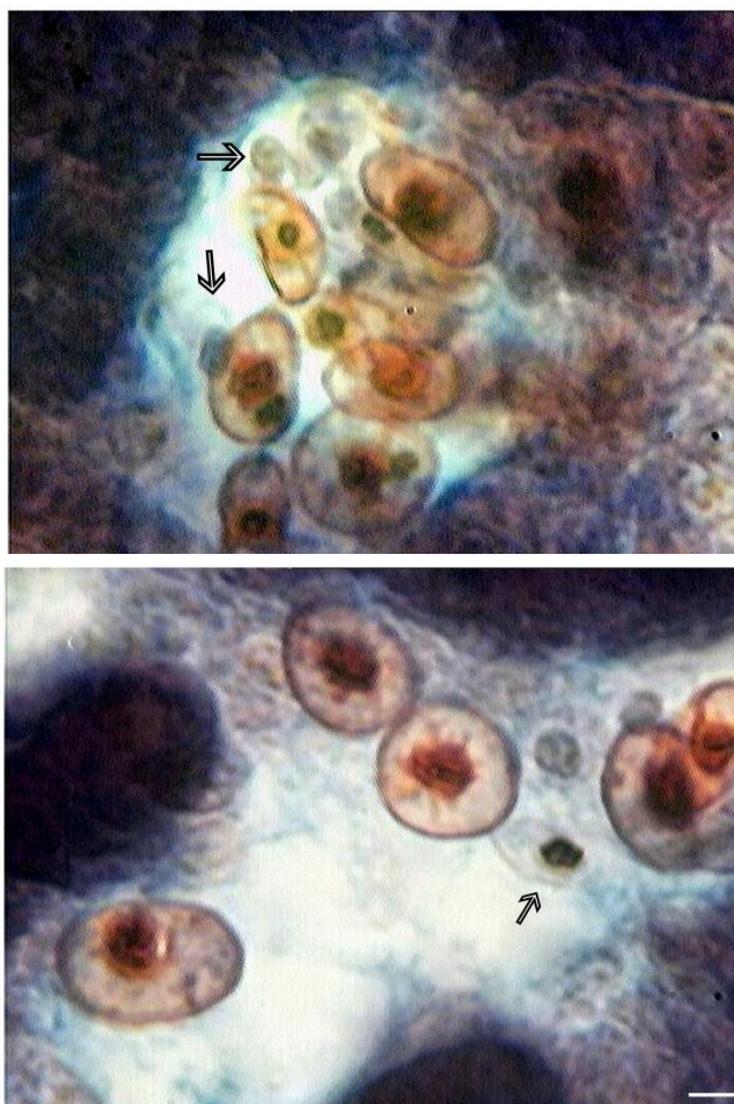


Рисунок 27. Примитивные эритроидные (крупные овальные клетки) на 25-е сутки внутриутробного развития эмбриона свиньи. Продольный срез печени, более поздние эритробласты показаны стрелками. Окраска по Маллори. Шкала 10 μm .

С точки зрения эритропоэза у свиней 25 дневный эмбрион представляет наибольший интерес, т.к. наряду с примитивным эритропоэзом в печени свиньи, выявляются клетки меньшего размера, которые являются сравнительно более зрелыми формами клеток эритропоэза. Зрелые безъядерные эритроциты (меньшего размера по сравнению с примитивными) обнаруживаются в сосудах эмбриона уже в возрасте 25-го зародыша, однако в значимом количестве они появляются в циркуляции гораздо позднее.

У 45-55-дневного плода печень не обнаруживает подразделения на дольки. Железистая паренхима представлена плотными анастомозирующими клеточными тяжами и напоминает своим строением губку. Между эпителиальными тяжами, плотно прилегая к ним своими стенками и заполняя все свободные промежутки, располагается сеть широких венозных капилляров. У 45-дневных плодов они шире и занимают больше места в общей площади среза.

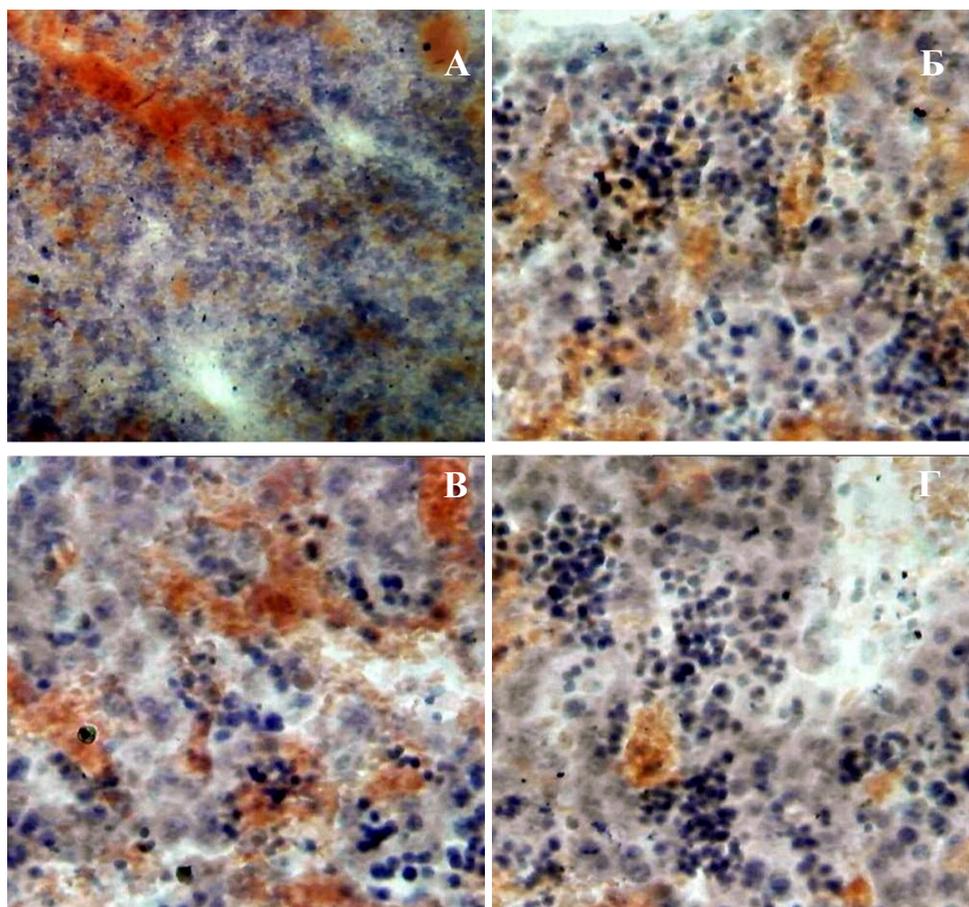


Рисунок 28. Печень 45-дневного плода свиньи. Заметны множественные очаги эритропоэза.

Окраска гематоксилин-эозином, с докраской суданом III.

А - увеличение 50X; Б, В, Г- увеличение 300X.

Кроветворение в печени происходит экстраваскулярно, - по ходу капилляров, растающих вместе с мезенхимой внутрь печеночных долек. Очаги эритропоэза занимают значительную часть паренхимы органа (рис. 28, 29). На 45-55 сутки внутриутробного развития плода свиньи, подавляющее большинство циркулирующих эритроцитов представлено зрелыми формами. В этот период также, выявляется значимое количество эритробластических островков с центральным макрофагом. Эта часть эмбрионального эритропоэза будет рассмотрена ниже в изучении эритробластических островков свиньи.

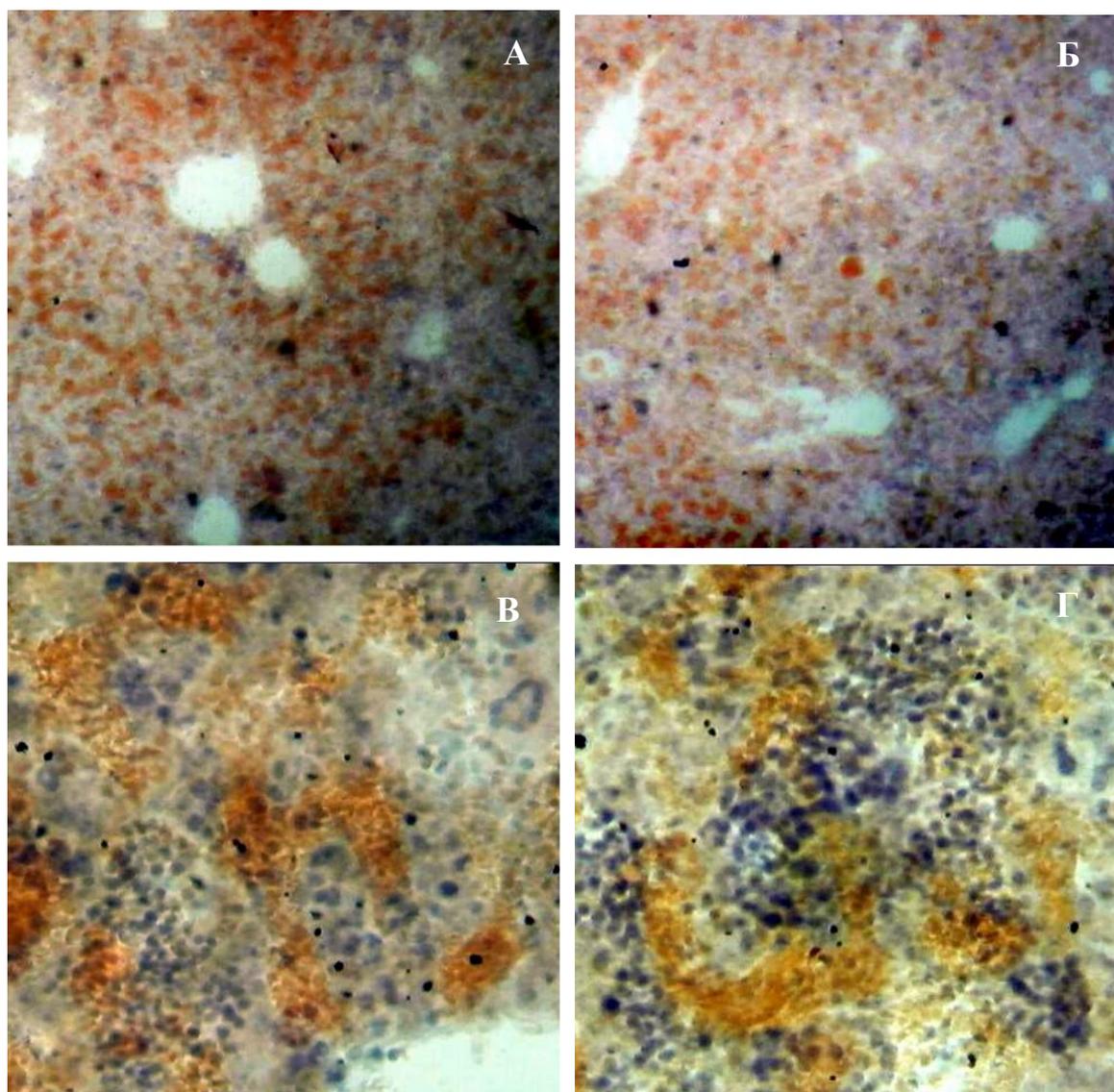


Рисунок 29. Печень 55-дневного плода свиньи.

На препаратах заметны очаги эритропоэза.

Окраска гематоксилин-эозином, с докраской суданом III.

А, Б - увеличение 50X; В, Г - увеличение 300X.

На 65-сутки внутриутробного развития свиньи в печени, можно видеть увеличение общей массы капилляров, в основном, более мелких, чем у ранних плодов (рис. 30). Тот же процесс наблюдается и в печени 90-дневных плодов, однако у последних можно отметить уже начало образования долек, путем врастания соединительной ткани по ходу кровеносных сосудов. Таким образом, печень 90-дневных плодов уже не кажется столь однородной, как у более ранних плодов.

У новорожденных поросят еще сохраняются остаточные очаги эритропоэза, заметные на небольшом увеличении, (рис. 31А). На больших увеличениях заметны отдельные безъядерные эритроциты, свидетельствующие о сохранении эритробластических островков вплоть до этого срока (рис 31 В, С, D).

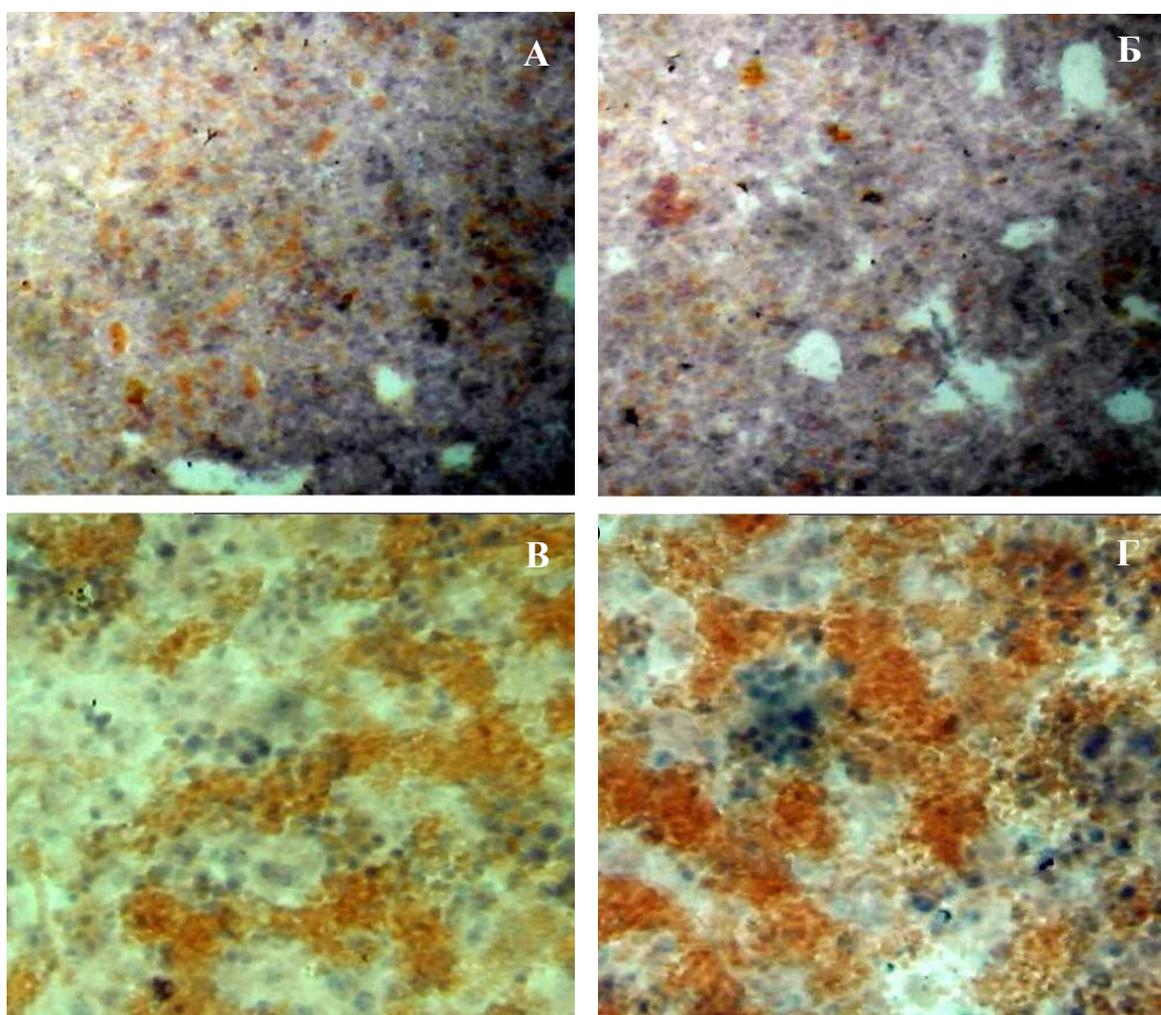


Рисунок 30. Печень 65-дневного плода свиньи. На препаратах заметны обширные очаги эритропоэза.

Окраска гематоксилин-эозином, с докраской суданом III.

А,Б - увеличение 50X; В, Г - увеличение 300X.

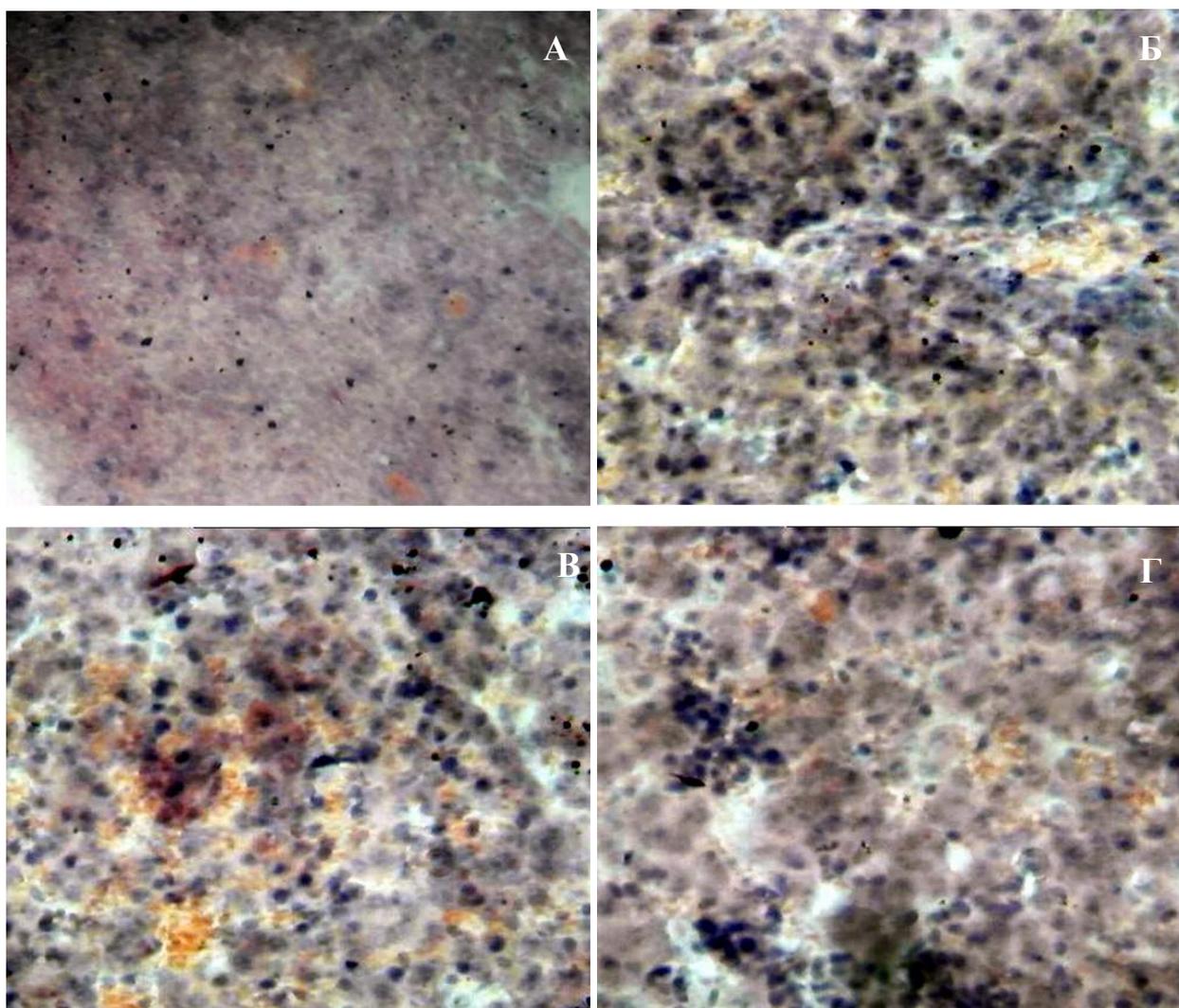


Рисунок 31. Печень новорожденного поросенка. На препаратах заметны единичные очаги эритропоэза.

Окраска гематоксилин-эозином, с докраской суданом III.

А - увеличение 50X; Б, В, Г - увеличение 300X.

Типичное же дольчатое строение, характерное для печени свиней, мы можем видеть только у месячных поросят. В этот период, на препаратах ясно видны печеночные балки, соединительнотканые междольковые прослойки, внутридольковые капилляры и центральные вены (рис. 32).

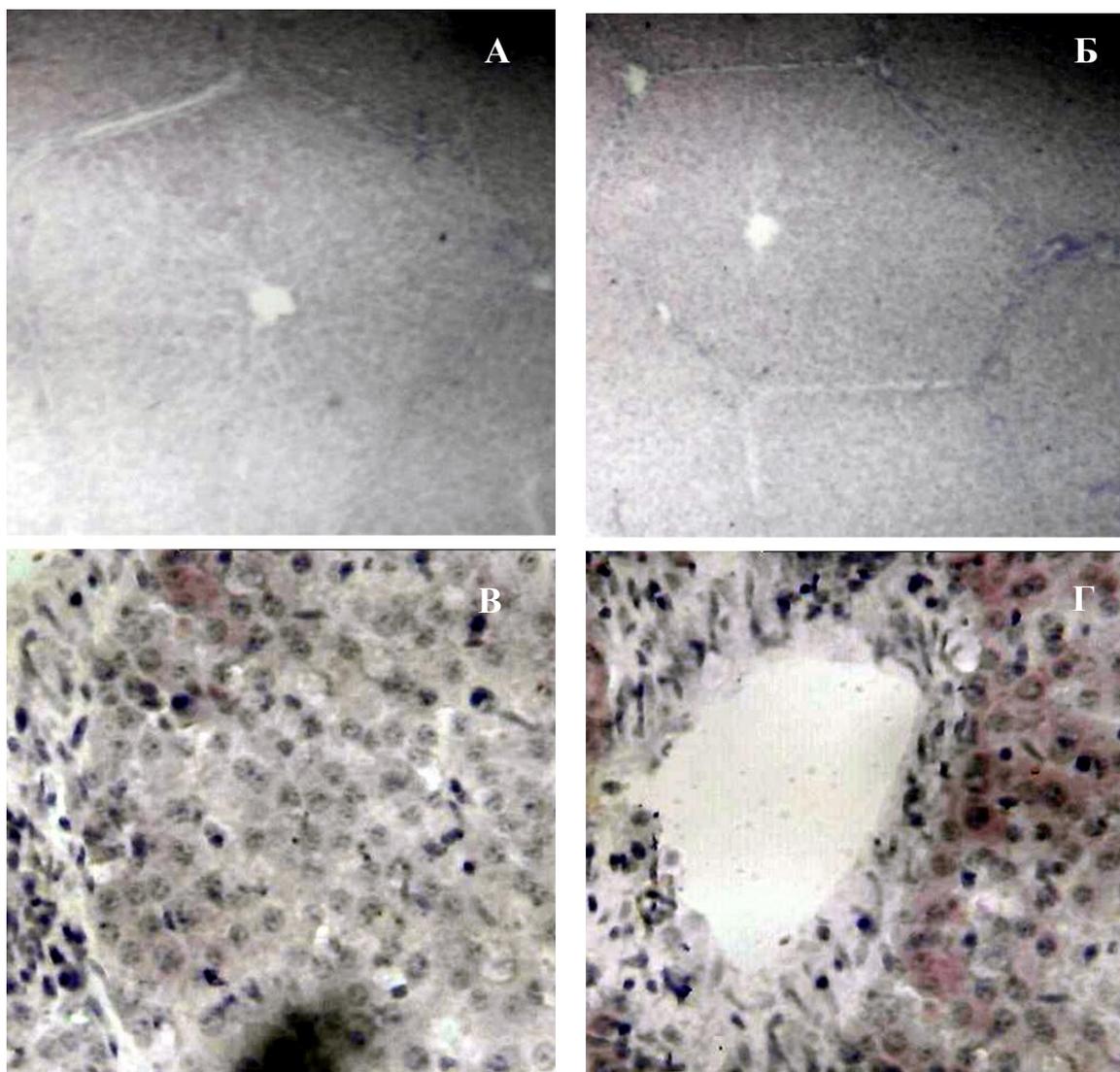
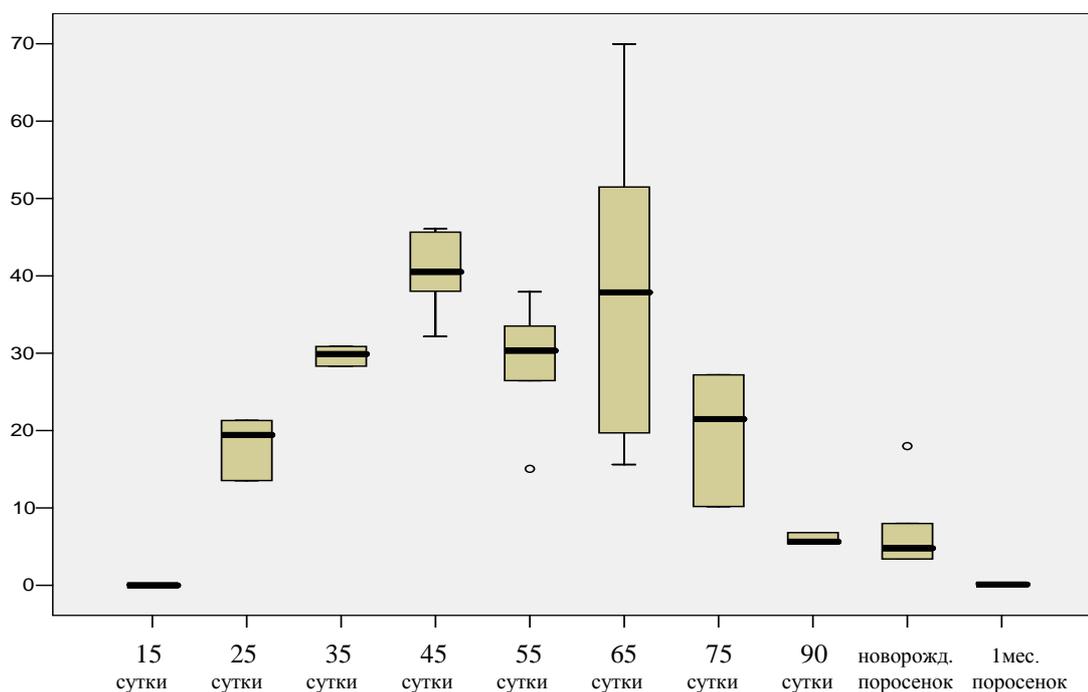


Рисунок 32. Печень 1 месячного поросенка. На препаратах видна гистологическая структура нормальной печени, а также отсутствие очагов эритропоэза.
 Окраска гематоксилин-эозином, с докраской суданом III.
 А,Б - величение 50X; В, Г - увеличение 300X.

Как видно из графика 10 эритропоэз в печени начинаясь, примерно, с 25 дня развития эмбриона, достигает максимума у 45-65 дневного плода свиньи, а затем постепенно снижается. Впрочем, даже у новорожденного поросенка эритропоэз в печени продолжает функционировать и полностью исчезает лишь к первому месяцу постнатального развития свиньи.

График 10.

Эритропоз в ткани печени (%) на протяжении всего периода эмбрионального развития.

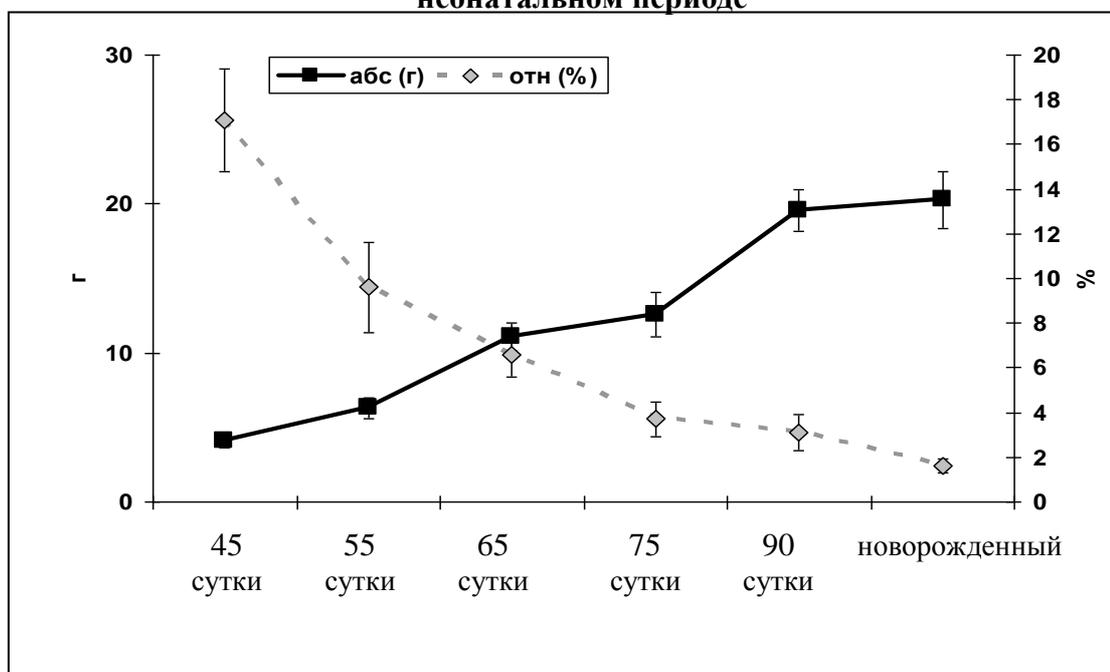


По оси абсцисс – возраст эмбрионов (сут).

По оси ординат – объем эритропоза в печени в %.

График 11

Динамика абсолютного и относительного веса печени свиньи в эмбриональном и неонатальном периоде



По оси абсцисс – возраст эмбрионов (сут). По правой оси ординат – доля печени в общей массе эмбриона (%). По левой оси ординат абсолютная масса печени (г)

Данные взвешиваний печени плодов различных возрастов, вычисление относительного веса и интенсивности роста, говорят о снижении интенсивности роста и относительного веса ее в течение плодного развития (график 11). Это снижение свойственно не только печени, но и вообще всем тем внутренним органам, которые очень рано, еще в зародышевом периоде, достигают максимальной интенсивности своего роста и развития, как например, головной мозг, сердце и др.

Согласно современным представлениям, процессы гепатогенеза и гемопоэза тесно взаимосвязаны. Об этом свидетельствует, в частности, корреляция между фенотипическими характеристиками эмбриональных клеток печени - гепатоцитов и активностью кроветворения в печени [Fukumoto T., 1992; Ohata S. et al., 2009]. При этом, все функции печени значительно усиливаются с началом затухания гемопоэза, что возможно, служит сигналом к переключению печени на созревание [Guo Y. et al., 2009]. Эти данные помогают объяснить необычную динамику абсолютного и относительного веса печени свиньи в эмбриональном и неонатальном периоде. Уменьшение относительных размеров печени совпадает по времени с угасанием эритропоэтической функции данного органа.

Такой своеобразный рост печени в течение внутриутробной жизни и изменение гистоструктуры ее в последний месяц плодного развития можно объяснить перестройкой, происходящей в печени за это время. Бурный рост печени в первую половину эмбриональной жизни объясняется, как уже было сказано, развитием ее кроветворной деятельности. В последние же месяцы внутриутробной жизни и после рождения главными функциями печени становятся пищеварительная и защитная, в связи с чем происходит описанный процесс изменения гистоструктуры печени в это время. Интересно, в связи с этим отметить, что в первый месяц после рождения печень, по нашим данным, снова повышает интенсивность своего роста, благодаря чему увеличивается и ее относительный вес.

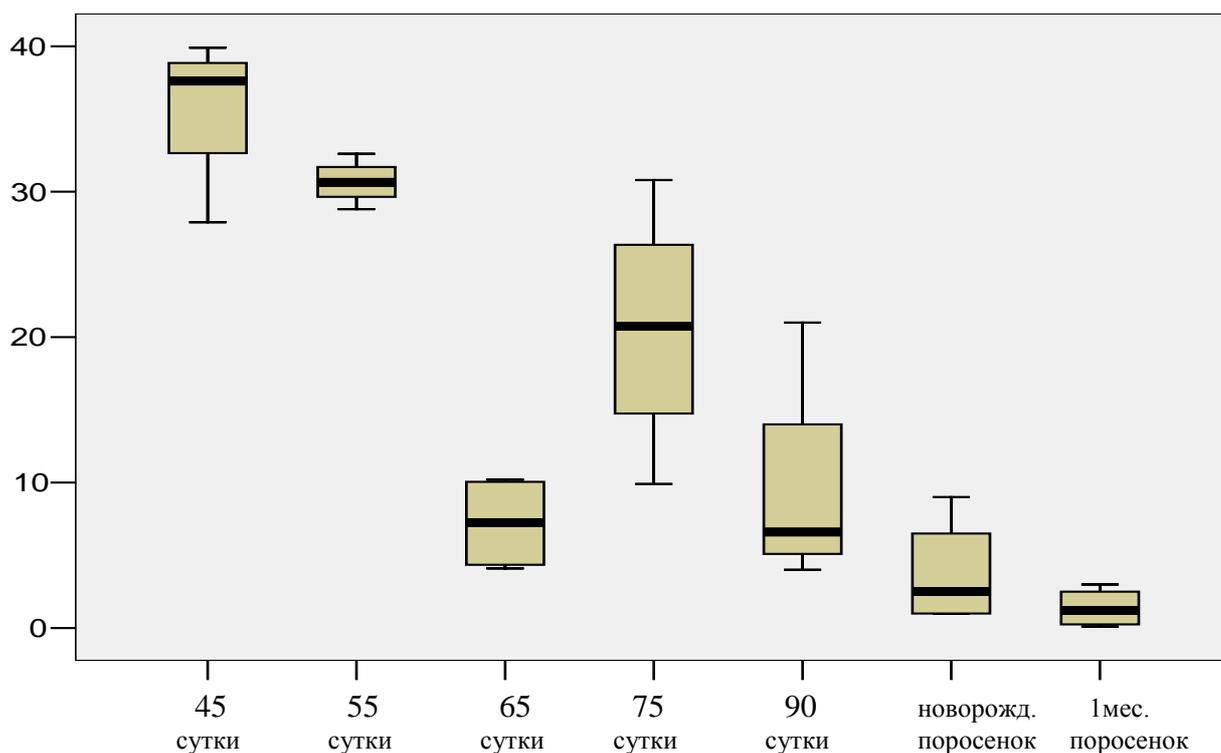
3.6. Эмбриональный эритропоэз в селезенке

Еще одним очагом гемопоэза, который формируется в эмбриональном периоде, является селезенка. Селезенка формируется раньше, чем в ней обнаруживаются циркулирующие гемопоэтические предшественники. Они начинают появляться в селезенке свиней на 45-55 дни развития плода.

Как следует из графика 12, объем эритропоза в ткани селезенки, несомненно, весьма велик, уже к 45 суткам пренатального развития свиньи, однако с учетом малой относительной массы селезенки, объем эритропоза в ткани селезенки значительно уступает таковому в печени.

График 12

Объем эритропоза в ткани селезенки (%) на протяжении всего периода эмбрионального развития.



По оси абсцисс – возраст эмбрионов (сут).

По оси ординат – объем эритропоза в селезенке в %.

С увеличением размеров селезенки объем эритропоза достигает достаточно значимых абсолютных величин, несмотря на уменьшение доли селезенки, занятой в эритропозе. Также надо добавить, что основной частью гемопоэза в селезенке, особенно на ранних этапах является не эритропоз, а миелопоэз.

С точки зрения эритропоза селезенка у свиней становится весьма важной в плодном периоде внутриутробного развития. Очаги эритропоза в селезенке, становятся хорошо заметными на 55-75-сутки внутриутробного развития плода свиньи и их высокий уровень сохраняется до конца пренатального периода (рис. 33).

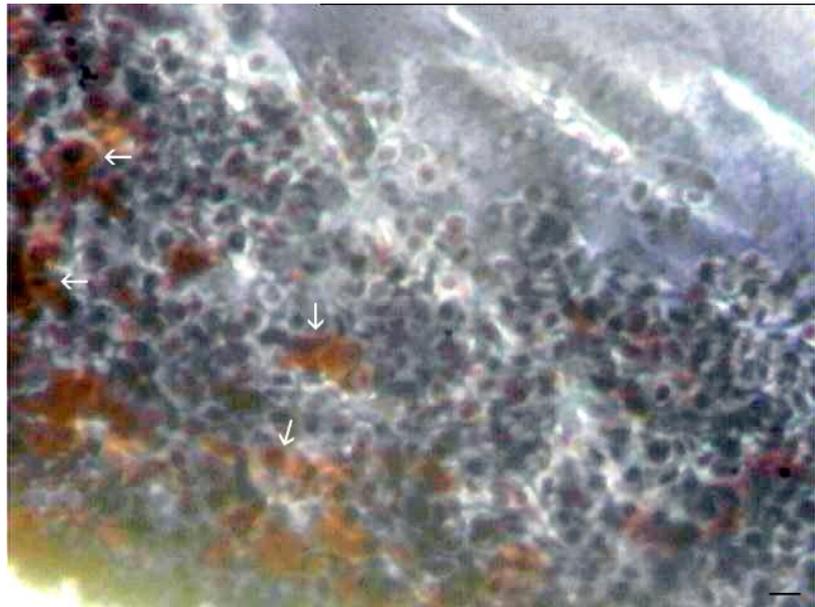
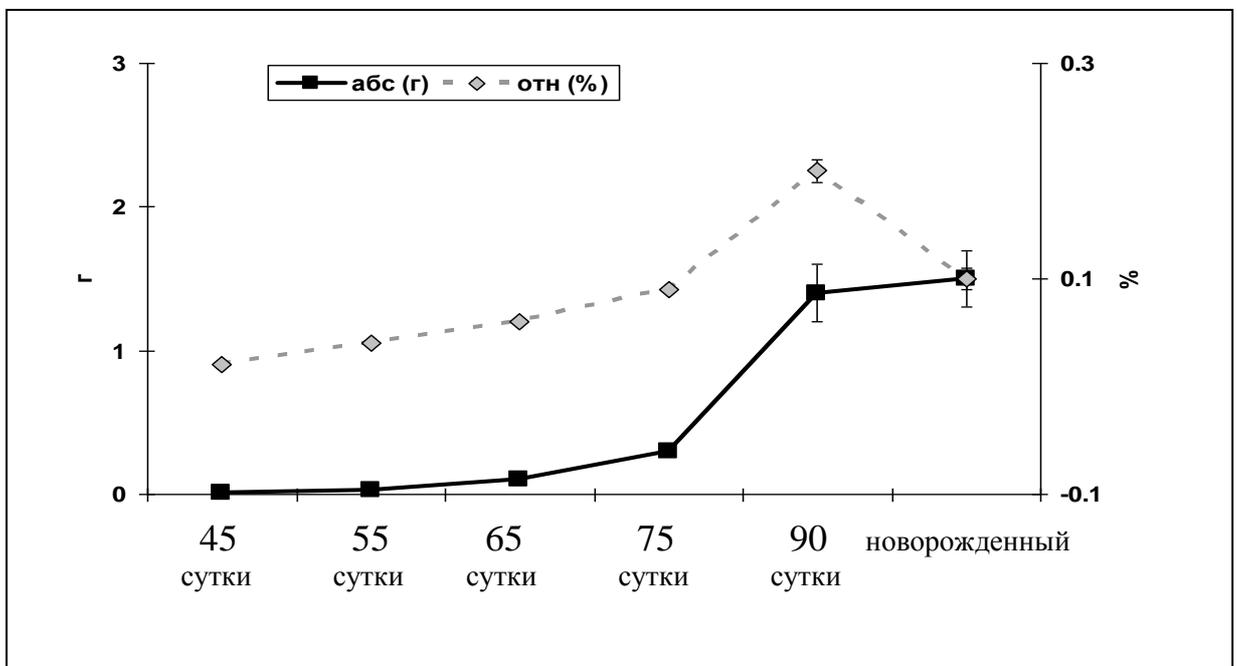


Рисунок 33. Селезенка. 75 сутки внутриутробного развития плода свиньи. Заметны очаги эритропоэза. Стрелками указаны крупные ядерные эритроидные клетки. Окраска азаном по Маллори. Шкала 20 μm .

График 13

Динамика абсолютного и относительного веса селезенки свиньи в эмбриональном и неонатальном периоде



По оси абсцисс – возраст эмбрионов (сут).

По правой оси ординат – доля селезенки в общей массе эмбриона (%).

По левой оси ординат абсолютная масса селезенки (г)

Интересно, что в развитии селезенки плода не наблюдается характерного для сердца и некоторых других, онтогенетически более старых органов, снижения интенсивности роста и падения относительного веса в течение плодного развития. Селезенка интенсивно растет вплоть до 90-х суток внутриутробного развития плода свиньи и только затем, снижает интенсивность своего роста (график 13).

В это же время происходит падение относительного веса ее. Этот бурный рост, особенно с 65-го по 90-й дни внутриутробного развития, объясняется, по-видимому, началом ее функционирования. В связи с изложенным выше становится понятной сравнительно поздняя закладка и развитие селезенки, бурный рост ее в течение плодного периода внутриутробного развития свиньи, когда она увеличивает свой вес в 318,7 раз. Помимо кроветворения другим специфическим свойством селезенки является, также, ее гемолитическая функция [Федоровская Н.С. и соавт., 2012].

3.7. Кроветворение в костном мозге

У свиней костный мозг появляется на начальном этапе эмбриогенеза, к концу первого месяца внутриутробного развития эмбриона. Впервые костный мозг появляется в плоских костях и позвонках, а затем в трубчатых костях конечностей. На начальном этапе внутриутробного развития свиньи гемопоэтическая активность в костном мозге не обнаруживается. Это явление характерно для многих млекопитающих, включая человека. Помимо мезенхимальных клеток в будущем костном мозге выявляется значительное количество остеокластов и остеобластов. Костный мозг на этой стадии внутриутробного развития называют первичным или остеобластическим [Куприкова И.М. и соавт, 2012].

Формирование красного костного мозга у свиней начинается в ранний период эмбриогенеза, во время образования хрящевого скелета. У 25-дневного эмбриона свиньи в хрящевом скелете появляется полость, в которой выявляются остеобласты, остеокласты и ретикулярные клетки (рис. 34). Васкуляризация раннего (незрелого) костного мозга слабая, а характерные синусоидные капилляры еще не сформированы.

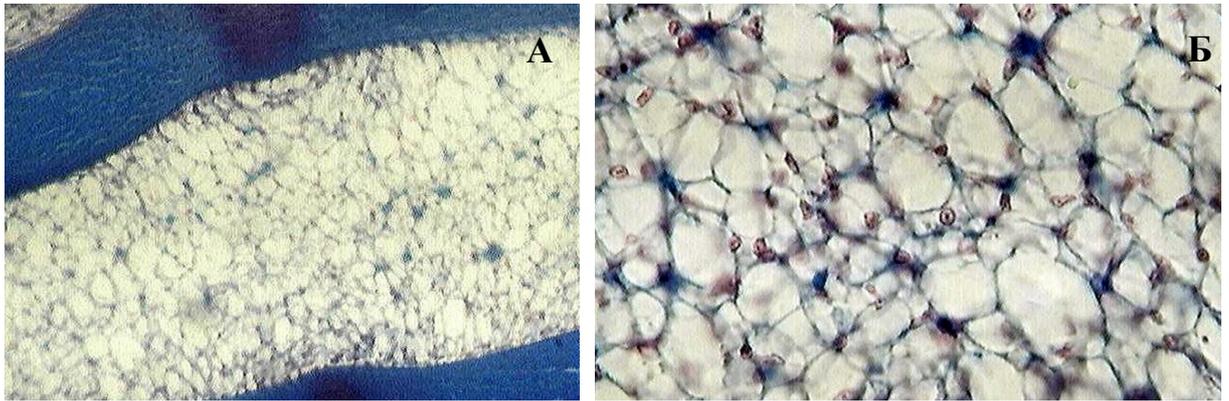


Рисунок 34. Развитие полости в хрящевом скелете 25 дневного эмбриона свиньи.

Ретикулярные клетки окрашены красным. Окраска азаном по Маллори.

А – увеличение 120X; Б - увеличение 300X.

Необходимо отметить, что на данном этапе нами выявлена достаточно интенсивная пролиферация стромальных клеток будущего костного мозга (рис 35). Затем, вокруг формирующихся сосудов микроциркуляторного русла происходит усиленное образование гемопоэтических клеток, входящих в состав миелоидной ткани. К моменту рождения все костные полости заполнены красным костным мозгом, сохраняющимся у грызунов и во взрослом состоянии. У большинства млекопитающих, со временем в диафизах конечностей и хвостовых позвонках красный костный мозг превращается в желтый (жировой), а у птиц он в незначительном количестве сохраняется во всех костях [Корвин-Павловская Е.Г. и соавтр., 1978].



Рисунок 35. Деление стромальных клеток в хрящевом скелете

25 дневного эмбриона свиньи. Окраска азаном по Маллори. Увеличение 1200X.

Эмбриональный костный мозг заметно отличается от центров более раннего развития гемопоэза тем, что образование миелоидных клеток здесь идет особенно интенсивно и преобладает в гемопоэзе на ранних этапах. Гемопоэз в костном мозге эмбриона свиньи начинается на 45 ± 5 -сутки внутриутробного развития зародыша. Заметны первые, единичные клетки гемопоэза, из которых на следующих этапах развития (55-75 дни развития зародыша) возникает костномозговой миелопоэз (рис. 36). Надо отметить, что, как и в других очагах гемопоэза, в костном мозге начало кроветворной функции закладывается первичными эритробластами, имеющими характерный вид. Однако, первичные эритробласты быстро исчезают и уже на 65-и сутки внутриутробного развития плода свиньи они не обнаруживаются. Тем самым, можно полагать, что несмотря на более позднее развитие эритропоэза в костном мозге, небольшая (статистически невыявляемая) часть клеток переходит в ядерные формы эритроцитов.

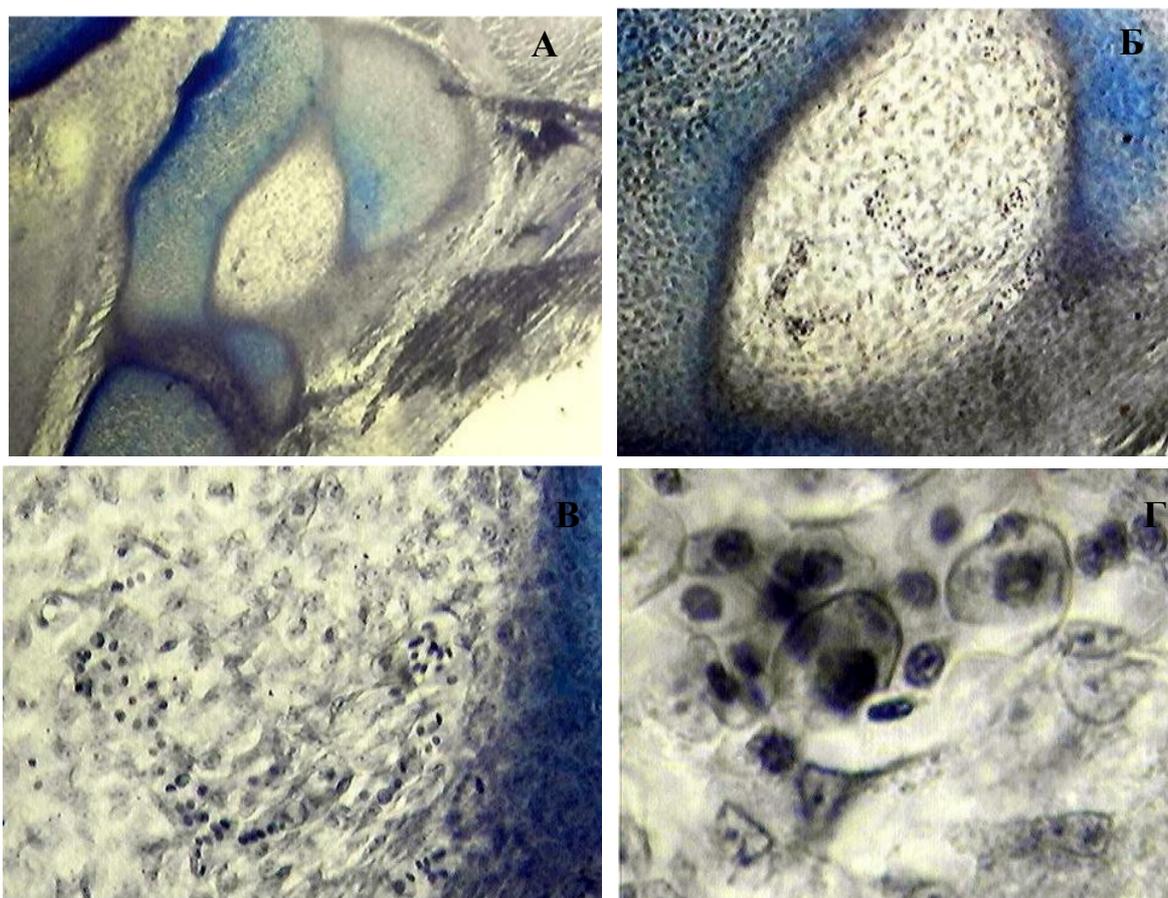


Рисунок 36. Начальный этап развития паренхимы костного мозга позвонка скелета 45 дневного эмбриона свиньи. Заметен единичный очаг гемопоэза.

Окраска азаном по Гейденгайну.

А - увеличение 50X; Б - увеличение 120X;
В - увеличение 300X; Г - увеличение 1200X.

Необходимо отметить, что на раннем этапе внутриутробного развития плода свиньи паренхиматозные клетки в костном мозге либо отсутствуют, либо их количество чрезвычайно мало вплоть до 55-65 дня внутриутробного развития зародыша свиньи.

В хрящевом скелете бедренной кости на 45-сутки внутриутробного развития зародыша выявляется полное отсутствие паренхиматозных клеток (рис. 37). Только, начиная с 55-65 дня гестации, возникают отдельные очаги гемопоэза, но при этом, уровень эритропоэза относительно незначительный (в пределах нескольких процентов от общего числа клеток). Необходимо отметить также, что окраска препаратов азаном по Маллори дает возможность оценить соотношение эритроидной и миелоидной популяций в костном мозге (рис 38).

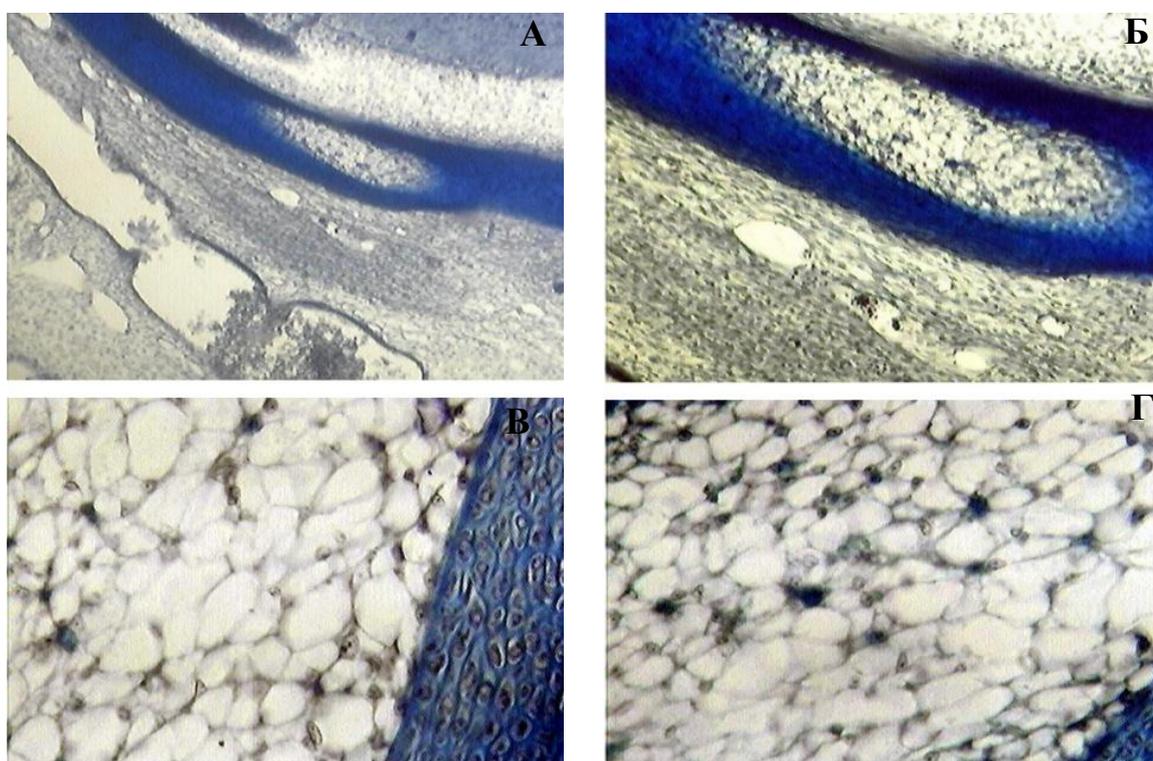


Рисунок 37. Костный мозг хрящевого скелета бедренной кости, 45 сутки зародыша свиньи.

Заметно отсутствие паренхимы костного мозга. Окраска азаном по Генденгайну.

А - увеличение 50X; Б - увеличение 120X;

В - увеличение 300X; Г - увеличение 1200X.

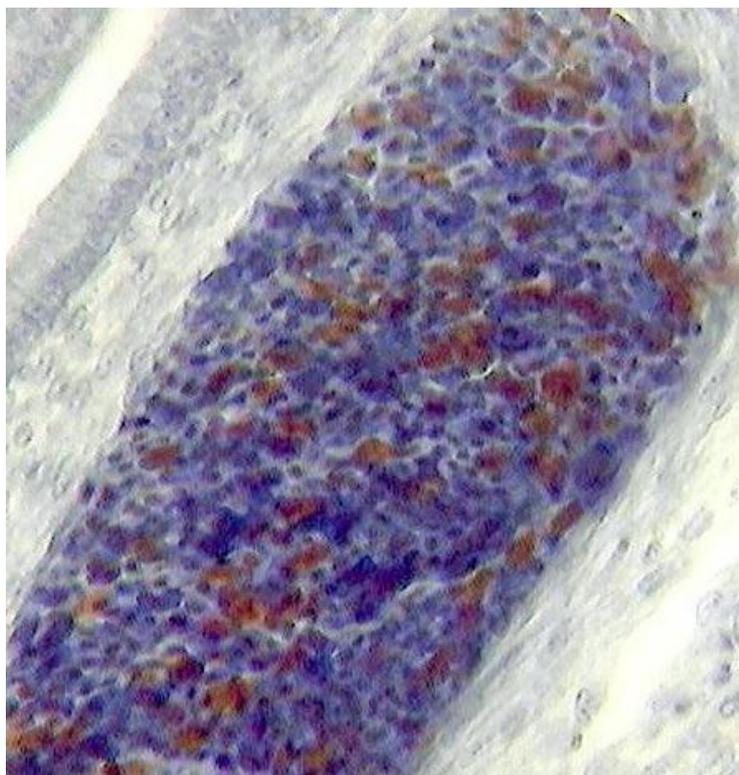


Рисунок 38. Костный мозг 65 дневного эмбриона свиньи.
Красный цвет соответствует эритроидной популяции, а синий – миелоидной.
Окраска азаном по Маллори. Увеличение 120X.

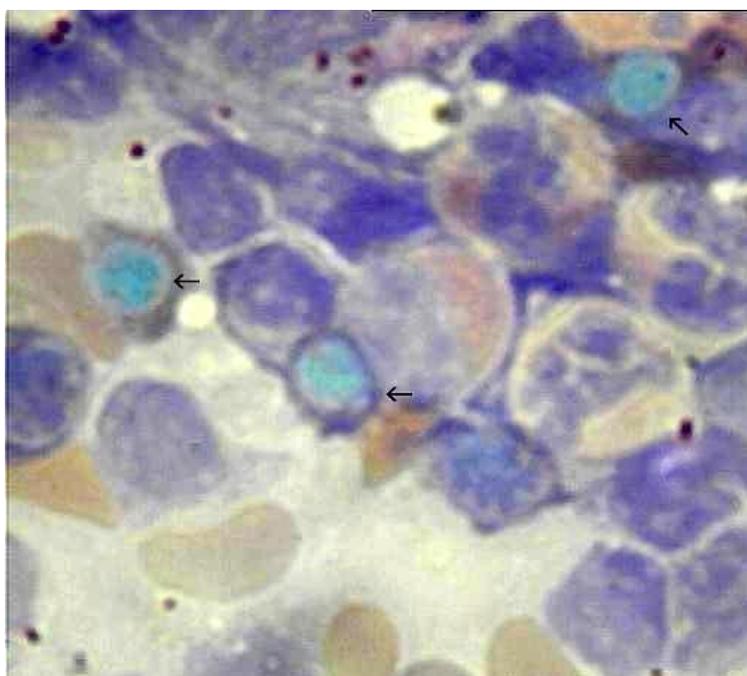


Рисунок. 39. Типичный клеточный состав костного мозга новорожденной (1 недельной) свиньи. В поле зрения выявляются 3 полихроматофильных эритробласта (отмечены стрелками). Окраска по Гимза. Увеличение 1200X.

Кроветворение в эмбриональном костном мозге свиньи отличается от предшествующих типов локализаций гемопоэза прежде всего тем, что здесь очень долго доминирует миелопоэз. На отпечатках костного мозга новорожденной свиньи, хорошо заметны полихроматофильные эритробласты, а на отпечатке костного мозга половозрелой свиньи выявляются как ортохромные, так и полихроматофильные эритробласты (рис. 39, 40).

Эритропоэз в костном мозге характеризуется образованием эритробластических островков, которые формируются вокруг центрального макрофага (данный тип эритропоэза будет рассмотрен ниже).

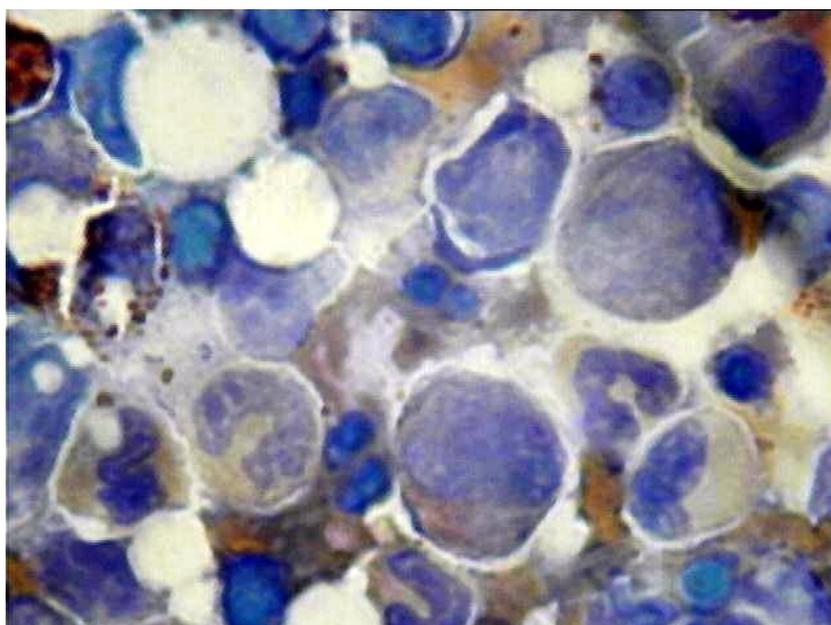


Рисунок 40. Типичный клеточный состав костного мозга взрослой (половозрелой) свиньи. В поле зрения встречаются многочисленные полихроматофильные и ортохромные эритробласты. Окраска по Гимза. Увеличение 1200X.

Необходимо добавить, что костный мозг новорожденных поросят продолжает характеризоваться содержанием значительного количества остеобластических элементов, что говорит о незавершенном созревании. Эритропоэтическая составляющая костного мозга у новорожденного поросенка становится значительной, достигая в сумме 22% от общего клеточного состава. С возрастом у поросят неонатального и молочного периодов, в плоских костях происходит увеличение количества красного костного мозга, достигая к четвертому месяцу жизни почти одной трети (31%) от общего клеточного состава (табл. 8). Тенденция к изменению популяционного состава становится достоверной к 65 дню.

На более позднем этапе исследования костного мозга свиней лишены интереса с точки зрения изучения эритропоэза. Дело в том, что в трубчатых костях поросят с возрастом уменьшается количество красного костного мозга и увеличивается количество желтого мозга [Соколов В.Г., 2016].

Таблица 8.

Изменения популяционного состава клеток (%) костного мозга в онтогенезе свиньи (M±SD).

Клетки	25-сутки	45 ¹ сутки	65 ¹ сутки	Новорожденный поросенок	Четырехмесячный поросенок
Моноциты	-	-	1±0.1	4±0.2	3±0.9
Монобласты	-	3±0.1	14±2.1	9±1.1	4±0.7
Лимфоциты	-	-	2±0.1	8±1.7	20±1.5
Лимфобласты	-	1 (?)	11±1.4	7±0.9	6±1.0
Миелоидные	-	22±3.0	34±3.9	12±1.8	9±1.8
Палочкоядерные нейтрофилы	-	-	1±0.1	12±2.2	10±1.3
Сегментоядерные нейтрофилы	-	-	-	6±1.0	4±1.4
Эозинофилы	-	-	1±0.1	4.1±1.4	8.5±1.9
Базофилы	-	-	-	0.9±0.1	1.5±0.6
Проэритробласты	-	-	1±0.1*	5±0.9*	6.0±0.9*
Большие бласты	-	-	2±0.2*	7±1.3*	11±1.1*
Малые бласты	-	-	2±0.1*	10±1.5*	14±2.7*
Остеобласты	100	74±5.7	31±4.3	15±2.6	3±0.8

*Примечание: *достоверно (p<0.05) по сравнению с более ранними сроками (применялся метод достоверности по статистическому критерию t-Student)
¹на данных сроках исследовались позвонки хрящевого скелета эмбриона.*

3.8. Онтогенез эритробластических островков свиньи.

У свиней в процессе эмбрионального развития гемопоэз предположительно начинается интраэмбрионально, который был зафиксирован нами на 13-15 дни гестации, впоследствии, к нему также присоединяется экстраэмбриональное кроветворение в желточном мешке и эритропоэз носит смешанный характер. Затем к нему присоединяется эритропоэз в печени. Кроветворение в печени происходит экстравакулярно вдоль хода

сосудов, а также впервые начинается формирование эритробластических островков с центральным макрофагом.

Согласно современным представлениям, макрофагам отводится значительная роль в регуляции функциональной активности гемопоэтических клеток. Именно макрофагами эритробластических островков создается специфическое микроокружение, которое играет ключевую роль в пролиферации и дифференцировке эритроидных клеток [Мао Х. et al., 2013].

Эмбриональное кроветворение свиней остается на сегодняшний день малоизученным [Pearson P.L. et al, 1998; Vallet J.L et al, 2003], а эритробластические островки свиней не исследованы вообще. На 15-сутки внутриутробного развития происходит формирование примитивных эритроидных клеток, которые вскоре формируют очаги кроветворения [Isern J. et al, 2010; Татоян М.Р., 2016].

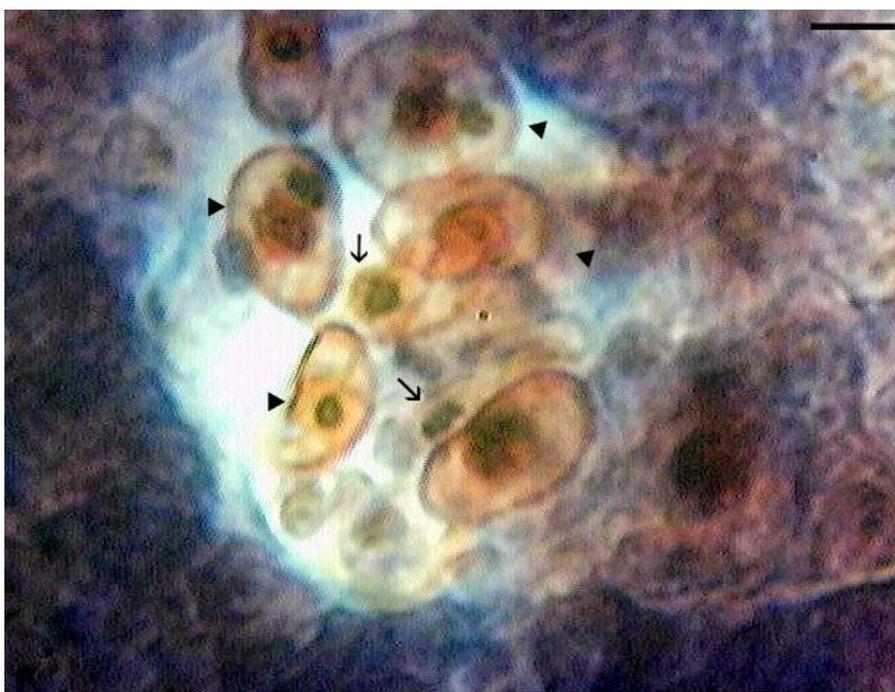


Рисунок 41. Продольный срез печени на 25 сутки внутриутробного развития эмбриона свиньи. Выявляются мегалобласты –клетки примитивного эритропоэза (показаны черными треугольниками) и нормобласты – клетки печеночной стадии эритропоэза (показаны черными стрелками). Окраска по Маллори. Шкала 10 μ m.

Это кроветворение является мезобластическим, идентичным кроветворению в желточном мешке. При этом, как во всех начальных очагах гемопоэза эритропоэз

происходит в кровяных островках без участия макрофага. На 25 сутки внутриутробного развития зародыша в сосудах эмбриона появляются клетки двух типов – мегалобласты (происхождение – желточный мешок) и нормобласты (происхождение – печень) (рис.41). Таким образом, на этом сроке в кровеносной системе эмбриона циркулируют две разные системы эритропоэтических клеток (мезобластические и нормобластические). Каждая из этих систем представлена несколькими типами клеток.

Изучение эмбрионального эритропоза у свиней выявило наличие безъядерных примитивных эритроцитов на самых ранних стадиях эмбриогенеза – 15 и 25 сутки внутриутробного развития свиней [Tatoyan M. et al., 2015]. Появление безъядерных эмбриональных эритроцитов в современной литературе часто связывается с началом формирования и функционирования печеночных эритробластических островков. Именно в них и происходит экструзия ядра эритробластов [Sonoda Y. et al, 1998].

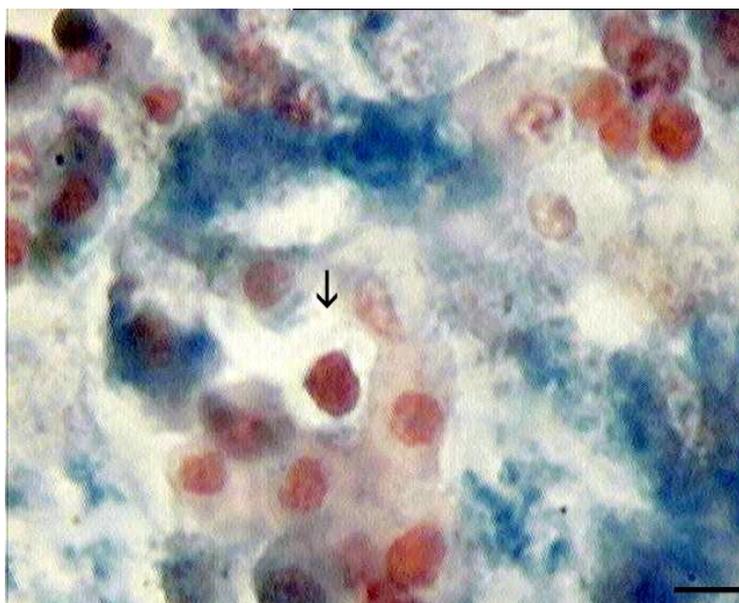


Рисунок 42. Макрофагоподобная клетка (указана стрелкой) в окружении гемопоэтических клеток. Печень на 25- сутки внутриутробного развития.

Окраска по Гимза. Шкала 10µm.

Однако, наши данные указывают на то, что эритробластические островки с центральным макрофагом у 15 суточного эмбриона свиней отсутствуют, а первые морфологически сходные образования (без фагоцитированного ядра) выявляются только на 25 сутки внутриутробного развития эмбриона свиньи, когда в печени начинают появляться макрофагоподобные клетки, морфологически отличные от гемопоэтических. Эти крупные

клетки, иррегулярной формы, обладающие большой, слабоокрашиваемой (по Гимза) цитоплазмой. Ядро этих клеток более интенсивно окрашивается при сравнении с гемопоэтическими клетками (рис. 42).

Таким образом, вопрос о механизме энуклеации примитивных эритроидных клеток (лизис ядра с помощью макрофага) у свиней в этот период остается открытым.

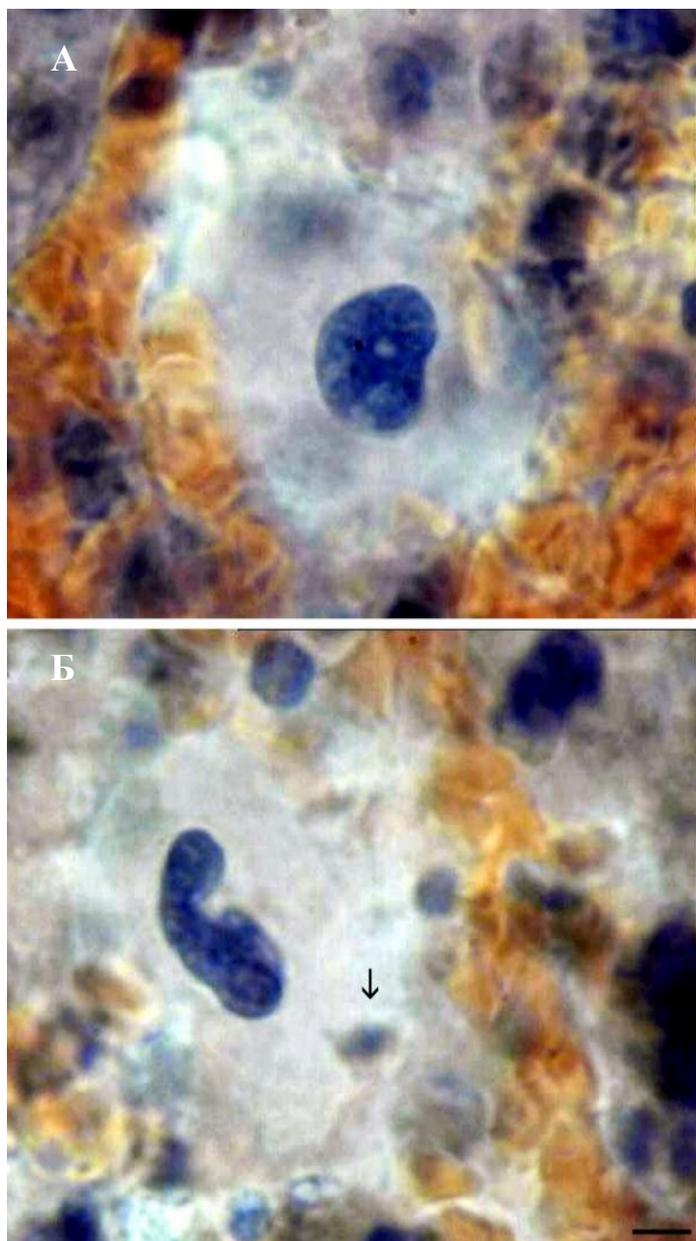


Рисунок 43. Эритробластический островок печени на 55-сутки внутриутробного развития.

Заметно фагоцитированное ядро эритробласта (указано стрелкой).

Окраска гематоксилин-эозином, с докраской суданом III. Шкала 10µm.

В эмбриональной печени свиньи эритробластические островки начинают формироваться с 35 дня гестации, а на 45-55 сутки эмбрионального развития свиней в печени выявляется значимое количество эритробластических островков с центральным макрофагом (рис.43А). Также, нами показана характерная для эритробластических островков экструзия ядра эритробласта с ее последующим фагоцитозом центральным макрофагом островка (рис 43В). Следовательно, появление безъядерных эритроцитов на данном этапе является результатом формирования эритробластических островков. Таким образом, в печени последовательно сменяются два типа эритропоэза – примитивный и дефинитивный

При сравнении печеночных и костномозговых эритробластических островков следует отметить, что площадь макрофагов эритробластических островков, расположенных в костном мозге превосходит более чем в два раза площадь макрофагов в печеночных эритробластических островках. При этом, в окружении центрального макрофага эритробластического островка в костном мозге находятся в два раза больше ядросодержащих эритроидных клеток, по сравнению с печеночными эритробластическими островками. Содержание белка в исследуемых эритробластических островках не имели достоверных отличий (табл. 9).

Таблица 9.

Цитофотометрические и функциональные показатели эритробластических островков печени и костного мозга свиней (M±SD).

Расположение	Площадь макрофага (μm^2)	Суммарное содержание белка в макрофаге (сг)	Количество ядросодержащих эритроидных клеток в ЭО
Эмбриональные эритробластические островки печени	702.2±69.7	188.1±53	4.4±1.1
Эритробластические островки костного мозга 3 месячных поросят	1613.5±352*	271.4±68	9.0±1.9*

*Примечание: * достоверно ($p < 0.05$) в сравнении с печеночными эритробластическими островками (применялся метод достоверности по статистическому критерию t-Student)*

На рисунке 44 приведен типичный эритробластический островок (ЭО) костного мозга трехмесячного поросенка, где заметна типичная корона эритробластического островка, с содержанием различных ядросодержащих эритроидных клеток.

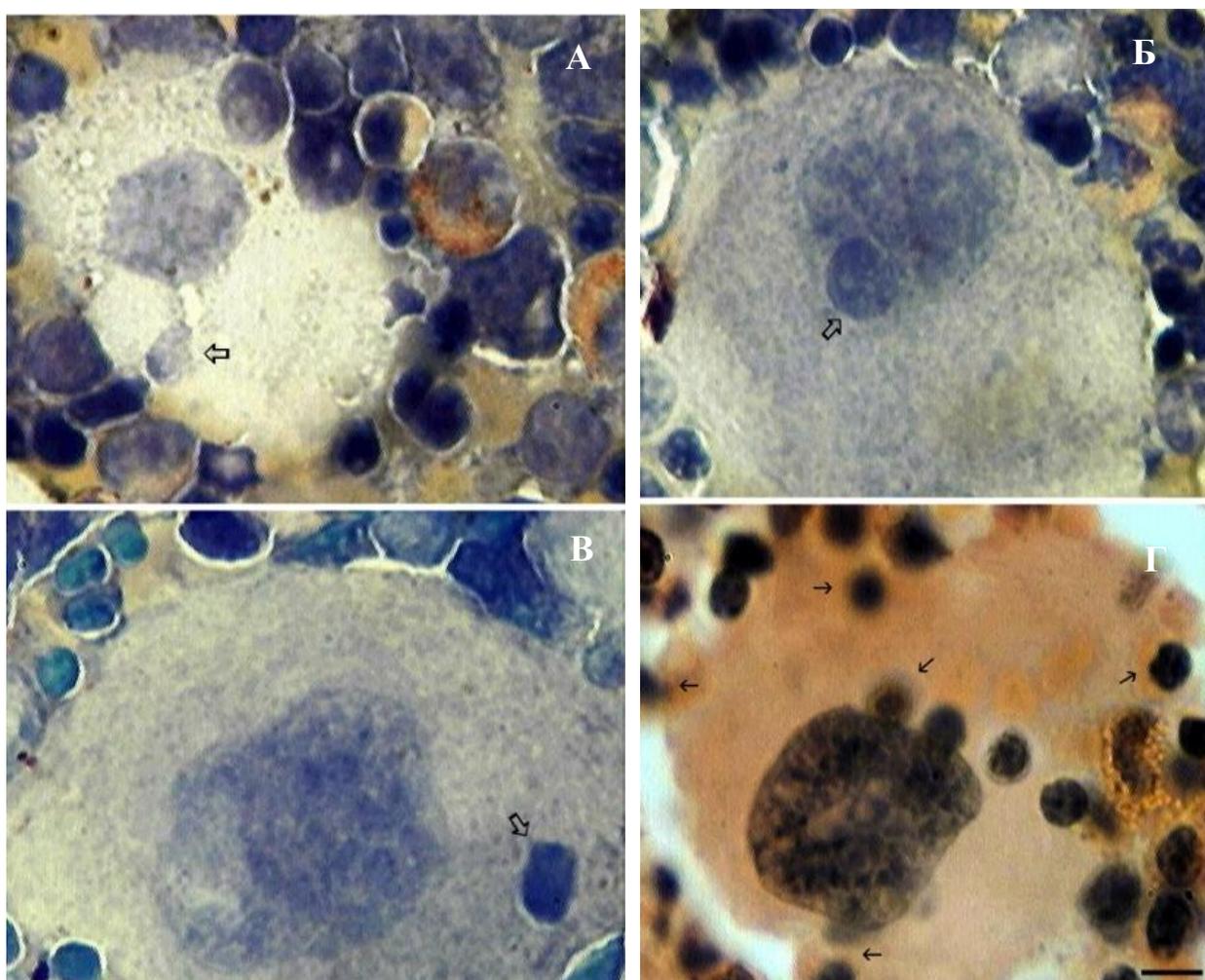


Рисунок 44. Эритробластические островки (ЭО) костного мозга 3-х месячного поросенка.

Эритробласты показаны черными стрелками, фагоцитированные ядра - прозрачными стрелками. Отпечатки аспирата (А, Б, В). Окраска по Гимза. Срез ЭО костного мозга (Г).

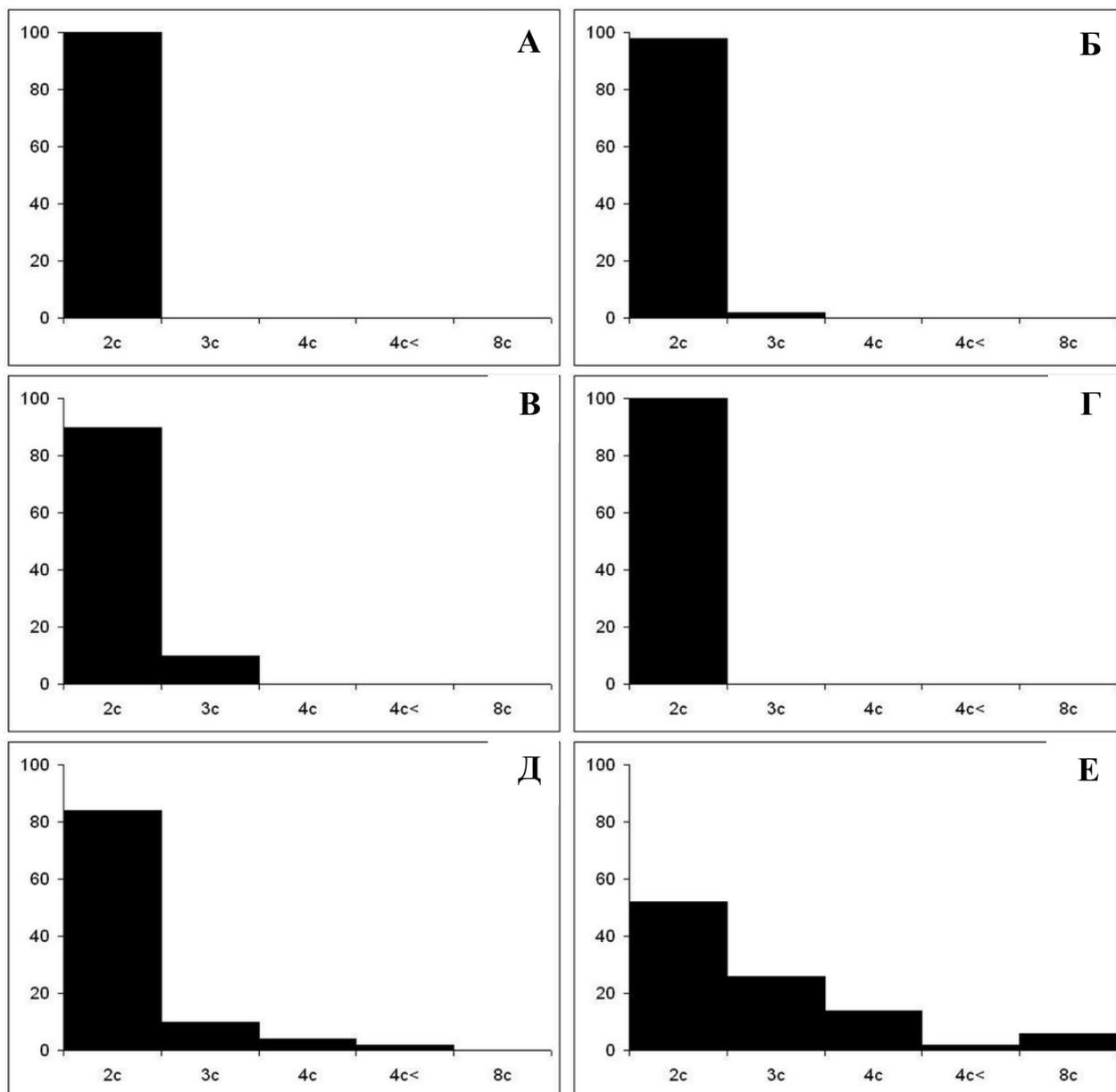
Окраска гематоксилин – эозином, с докраской суданом III. Шкала 10 μm .

Популяция макрофагов печеночных эритробластических островков в основном диплоидная и лишь, небольшая часть на 55-65 сутки внутриутробного развития плода гипердиплоидна. С учетом данных по вовлечению ткани печени в эритропоэз (см. глава 3.5) можно полагать, что увеличение содержания ДНК в ядрах макрофагов печеночных эритробластических островков связана с возрастанием участия печени в общем эритропоэзе,

а снижение содержания ДНК в ядрах макрофагов совпадает с угасанием печеночного эритропоэза (граф. 14).

График 14.

Распределение ядер макрофагов по классам плоидности в эритробластических островках (ЭО) эмбриональной печени и в костном мозге.



- А. 45-сутки макрофаги печеночных эритробластических островков;*
- Б. 55-сутки макрофаги печеночных эритробластических островков;*
- В. 65-сутки макрофаги печеночных эритробластических островков;*
- Г. 75-сутки макрофаги печеночных эритробластических островков;*
- Д. макрофаги костного мозга новорожденных поросят;*
- Е. макрофаги костного мозга трехмесячных поросят*

Для популяции макрофагов костномозговых эритробластических островков, характерно наличие как диплоидных и гипердиплоидных, так и тетра- и гипертетраплоидных клеток. А с увеличением срока гестации в костномозговых эритробластических островках возрастает и содержание ДНК в ядрах центральных макрофагов. Если у новорожденных поросят в эритробластических островках костного мозга более 80% макрофагов диплоидны, то у трехмесячных поросят диплоидными оказались всего около 50% макрофагов. Вероятно, повышение содержания ДНК в ядрах макрофагов, приводит к увеличению функциональной активности всего эритробластического островка. В пользу этого говорят и данные по макрофагам лимфатических узлов, селезенки [Karalova E.M. et al., 1990], а также сходные процессы в мегакриоцитах и ряде других клеток [Anatskaya O.V., Vinogradov A.E., 2010; Raslova N. et al, 2003].

Таким образом, полиплоидизация ядер центральных макрофагов эритробластических островков в костном мозге свиней скорее всего связана с функциональной нагрузкой, т.е. с повышенной продукцией эритроцитов.

Существуют различия в количестве эритроидных клеток в эритробластических островках у различных видов млекопитающих. При исследовании эритробластических островков костного мозга крыс выявляются около 10 эритроидных клеток на островок [Yokoama T. et al., 2002], тогда как на эритробластический островок костного мозга людей приходится от 5 до 30 эритробластов [Lee S.H. et al., 1988]. У свиней, в доступной нам литературе, данные по содержанию эритробластов в эритробластических островках отсутствуют. Наши данные показывают, что на эритробластический островок костного мозга у 3-4 месячных свиней, в основном, приходится около 7-11 эритробластов. Здесь возникает одна из важных проблем эмбрионального развития эритропоэза, а именно определение сроков возникновения эритробластических островков. Наши данные четко указывают возникновение эритробластических островков в печени на 45 сутки и наличие схожих структур в незначительном количестве на 35 сутки внутриутробного развития свиньи. Несмотря на это, нами показано наличие безъядерных клеток, как на стадии примитивных эритроидных клеток, так и на начальной стадии печеночного эритропоэза [Tatoyan M. et al., 2015].

Проблема заключается в особенностях эритропоэза у млекопитающих. Зрелые эритроциты млекопитающих безъядерные и проходят заключительное созревание, лишаясь

ядра (энуклеация). У млекопитающих, на поздних стадиях эритропоэза этот процесс напрямую связан с существованием эритробластического островка с центральным макрофагом. На ранних этапах эритропоэза подавляющая часть эритроидных клеток желточномешкового происхождения имеет ядро [Palis J., 2008]. Однако, небольшая часть примитивных эритроидных клеток, у некоторых млекопитающих (свиньи, мыши) способна проходить энуклеацию и образовывать безъядерные мегалоциты [Bethlenfalvay N.C, Block M., 1970; Steiner R., Vogel H., 1973]. Тем не менее, из литературы известно что у изученных видов млекопитающих формирование эритробластических островков происходит в достаточно поздние сроки. Так у мышей развитие эритробластических островков приходится примерно на середину гестации [Sasaki K., Sonoda Y., 2000].

Некоторые источники предполагают, что макрофаги не обязательны для энуклеации ядер дефинитивных эритробластов *in vivo* [Spike B.T et al., 2007], т.к. выявлена популяция безъядерных примитивных эритроцитов образующихся в отсутствие макрофагов на ранних стадиях эритропоэза мышей. В отличие от [McGrath K.E., Palis J., 2008; Isern J. et al., 2010] автор не выявил энуклеации примитивных эритроидных клеток, при контакте с макрофагами в культуре фетальной печени. Однако, в работе [Rhodes M.M. et al., 2008] выявлено, что пролиферация дефинитивных эритробластов стимулируется в культуре с макрофагами.

Таким образом, роль макрофагов в пролиферации и/или на поздних этапах созревания примитивных эритроидных клеток (ранний эритропоэз), еще предстоит оценить. Неисключено, что энуклеация ранних, примитивных эритроидных клеток возможна без участия вспомогательных клеток. Необходимо добавить, что наши исследования показали появление безъядерных примитивных эритроцитов на ранних этапах эритропоэза свиней, в отсутствие макрофагов [Tatoyan M. et al., 2015]. В работе [Kingsley P.D et al., 2004] показана возможная энуклеация примитивных эритроидных клеток, обнаруженная у эмбрионов мышей. Однако, ни в их работе, ни в работах [Baron M. et al., 2012] данные по возможному механизму этого явления не приводятся.

В следующей главе мы представим онтогенез эритроидных клеток свиньи, начиная с зародышевого периода, когда только зарождается эритропоэз и вплоть до зрелого эритропоэза половозрелых свиней.

3.9. Онтогенез эритроидных клеток свиньи.

Известно, что эритропоэз млекопитающих онтогенетически и морфологически четко разделяется на две группы: это примитивный эмбриональный и окончательный взрослый эритропоэз, который, был описан для эмбрионов млекопитающих более века назад. Во время эмбрионального развития кроветворение осуществляет функции быстрого производства большого количества эритроидных клеток, поддерживающих рост и выживание эмбриона, а затем появляется поколение гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), которые сохраняются в течение всей жизни взрослых животных. Кроветворение в развивающихся эмбрионах позвоночных происходит в несколько этапов и в нескольких различных локализациях. Долгое время считалось, что первый этап осуществляется в желточном мешке и производит, в основном, примитивные эритроидные клетки, а также макрофаги и мегакарициты. Вторым этапом возникает также в желточном мешке, образуя эритроидные, мегакариоцитные, и несколько миелоидных линий. Третий этап выходит из ГСК, полученных в рамках основных артерий эмбриона желточного мешка, увеличивается в печени плода и в конечном счете в костном мозге. Дефинитивные эритроидные клетки непрерывно образуются из гемопоэтических стволовых клеток в костном мозге на протяжении всей постнатальной жизни животных [Isern J. et al., 2008; Ferkowicz M.J., Yoder M.C, 2005].

Таким образом, можно считать, что примитивные эритроидные клетки поддерживают жизнь быстро растущего плода, в то время как дефинитивные эритроциты имеют решающее значение при переходе от внутриутробной жизни к рождению. За последние несколько лет стало очевидным, что онтогенез и созревание этих линий являются более сложными, чем предполагалось ранее [Emura I. et al, 1983]. В дальнейшем рядом авторов [Baron M. et al., 2012], в том числе и нами [Tatoyan M. et al., 2016] было показано, что первые клетки крови появляются во время гаструляции в мезодерме и имеют интраэмбриональную локализацию, из которой впоследствии образуются парааортальная мезенхима и AGM-область. Весь период существования мезенхимального эритропоэза у свиней занимает около трех недель - он появляется на 13-15 сутки внутриутробного развития эмбриона и исчезает к 35 суткам. Пролиферативная активность гемопоэтических клеток мезенхимального эритропоэза снижается к 25 суткам и практически исчезает к 35 суткам внутриутробного развития зародыша свиньи. Содержание гемоглобина во всех исследуемых клетках не

отличается существенно от аналогичных клеток желточного мешка. Их количество невелико и больших разрастаний клеток крови, подобных кровяным островкам желточного мешка, в мезенхиме полости тела не формируется [Tatoyan M. et al., 2016]. Это согласуется с предположением, что в начале гемагиобласты образуют примитивные эритроидные линии вскоре после выхода из первичной эмбриональной полоски [Huber T.L. et al., 2004] и играют важную роль в раннем эмбриональном гемопоэзе. Они отличаются большими размерами и у млекопитающих содержат ядра [Godin I., Camano A., 2005; Tatoyan M. et al., 2016]. Это первый, так называемый ангиобластический период кроветворения [Jaffredo T. et al., 2005; Lu et al., 2008).

В желточном мешке клетки крови образуются в местах небольших скоплений мезодермальных клеток, называемых кровяными островками. В ранних кровяных очагах желточного мешка выявляются крупные, овальные недифференцированные гемопоэтические клетки, ширина их овальных ядер составляла 5-7 μm . При дальнейшей дифференцировке у зародышей свиней происходит округление гемопоэтических клеток и формирование примитивных эритроидных клеток (рис. 45, 46).

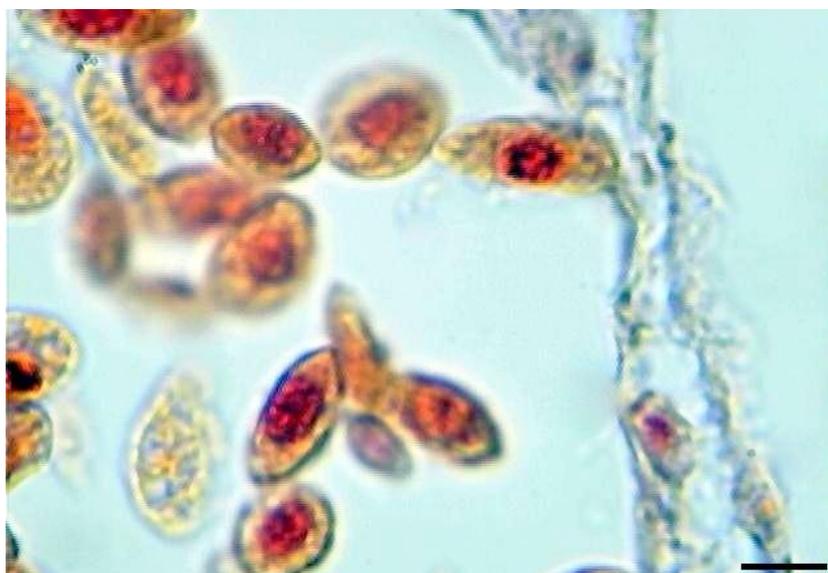


Рисунок 45. Примитивные гемопоэтические клетки в кровяном островке желточного мешка на 15-е сутки внутриутробного развития свиньи. Выявляются делящиеся клетки.

Окраска азаном по Маллори. Шкала 10 μm .

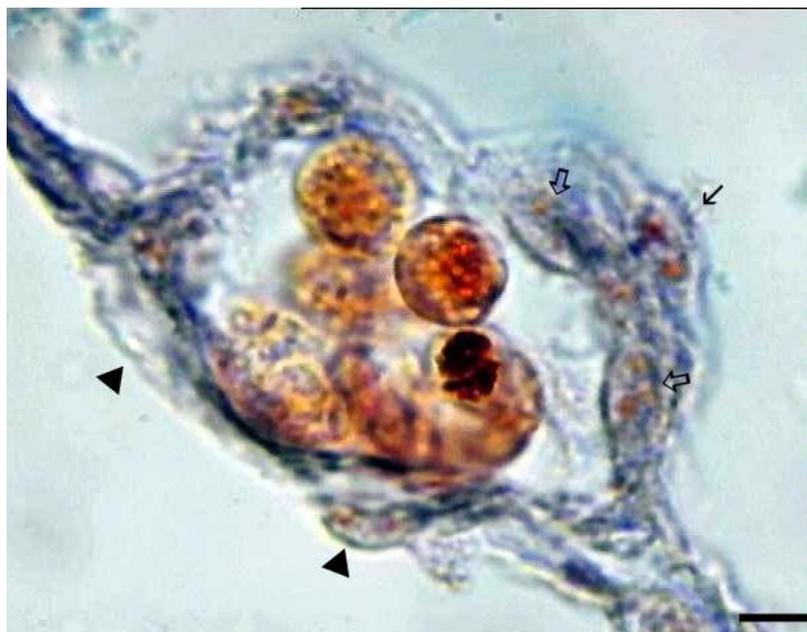


Рисунок 46. Примитивный кровяной островок желточного мешка на 15-е сутки внутриутробного развития эмбриона свиньи. Примитивные эритроидные клетки (окрашены красным), эндотелиальные и мезотелиальные клетки (голубая цитоплазма и красные ядра). Кровяной островок состоит из эритроидных клеток, окруженных эндотелием (прозрачные стрелки), расположенным между энтодермой (черные стрелки) и мезотелием (треугольники)
Окраска по Маллори. Шкала 10 μm .

При исследовании морфологии ранних эмбриональных эритроидных клеток свиньи выявлено, что для 25 дневного эмбриона свиньи характерно одновременное наличие в крови как примитивных эритроидных клеток, так и ранних печеночных эритроидных клеток (рис. 47), так как на 25-е сутки к желточному кроветворению присоединяется печеночное кроветворение. На 25-е и 35-е сутки нами были обнаружены в небольшом количестве безъядерные клетки крови, которые мы не учитывали.

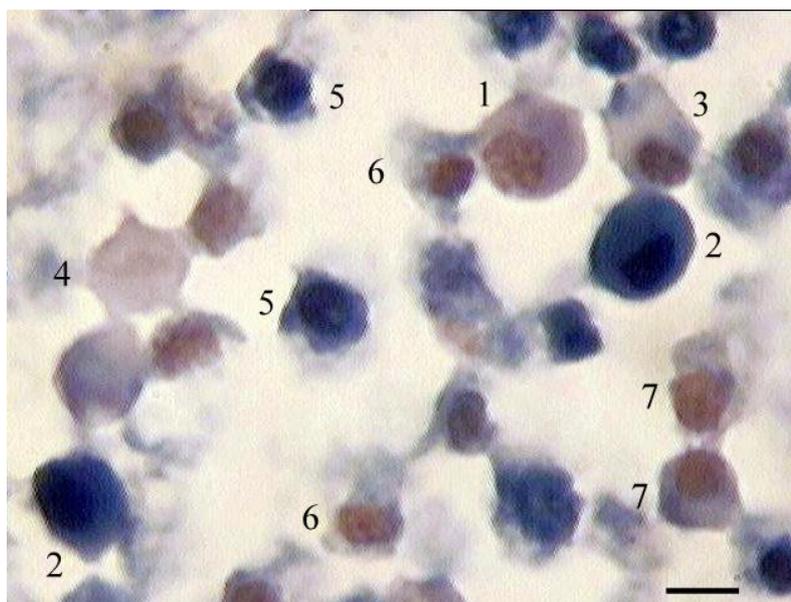


Рисунок 47. Ранние эритроидные клетки, срез сосудов 25-дневного эмбриона свиньи.

Окраска по Гимза. Шкала 10 μm .

Стадии примитивного и раннего печеночного эритропоэза.

1. Первая стадия примитивных эритроидных клеток (происхождение - интраэмбриональная мезенхима и желточный мешок);
2. Вторая стадия примитивных эритроидных клеток (происхождение - желточный мешок);
3. Третья стадия примитивных эритроидных клеток (происхождение - желточный мешок);
4. Примитивный эритроцит (происхождение желточный мешок);
5. Базофильный эритробласт (происхождение - печень);
6. Полихроматофильный эритробласт (происхождение - печень);
7. Ортохромный эритробласт (происхождение - печень).

Долгое время считалось, что первичные эритробласты образуются внутри сосудов желточного мешка, стенка которого является первым кроветворным органом у всех животных, имеющих желточный мешок [Yoder M.C., Hiatt K., 1999; Ghatrane S. et al., 2002]. В последнем содержатся полипотентные стволовые клетки, дающие начало всем росткам кроветворения [Kyunghee C., 2002; Zambidis T. et al., 2005; Tada T. et al., 2006; Isern J. et al., 2008; Sheng G., 2010).

Проведенный нами анализ изменения популяционного состава эритроидных клеток на всем протяжении гестации, представленный в таблице 1, выявил что, в сосудах желточного мешка на 25 сутки внутриутробного развития число бластных форм постепенно уменьшается, составляя 58% эритроидных клеток популяции, а на эритроциты приходится

42% клеток (табл. 10). Постепенно также увеличивается количество нормальных форм как среди бластов, так и среди эритроцитов, что вероятно связано с затуханием по мере развития эмбриона ангиобластического периода кроветворения.

Таблица 10.

Изменения популяционного состава эритроидных клеток (%) на разных стадиях эмбрионального развития свиней (M±SD).

Типы клеток	Дни гестации						
	15 сутки	25 сутки	35 сутки	55 сутки	65 сутки	75 сутки	90 сутки
Бласты							
Мелкие	5.0±0.6	22.0±2.5*	20.0±1.5*	10.5±1.0*	11.5±2.0*	5.1±0.8	0.8±0.003*
Крупные	58.0±6.1	36.0±1.9*	18.0±1.5*	5.9±0.05*	0.6±0.07*	-	-
Суммарный показатель	63.0±3.3	58.0±2.3	38.0±1.5	16.4±1.0	12.1±1.6	5.1±0.8	0.8±0.003
Эритроциты							
Мелкие	9.0±0.5	32.0±1.8*	54.0±1.5*	76.6±10.1*	83.3±8.5*	92.1±8.8*	95.6±5.5
Крупные	28.0±3.2	10.0±0.8*	8.0±0.9*	7.0±0.8*	4.6±0.5*	2.8±1.1*	1.6±0.7*
Суммарный показатель	37.0±4.1	42.0±1.3	62.0±2.8	83.6±10.1	87.9±7.9	94.9±9.3	98.2±4.6

*Примечание: *достоверно ($p < 0,05$) по сравнению с 15 дневным эмбрионом*

(применялся метод достоверности по статистическому критерию t-Student)

Необходимо добавить, что нами выявлено значительное уменьшение количества как крупных, так и мелких бластных форм, вплоть до почти полного их исчезновения (0.8% от общего числа эритроидных клеток популяции) на этапе эмбрионального костномозгового кроветворения (90 сутки гестации). При этом, на всем протяжении эмбрионального эритропоэза количество эритроцитов сильно увеличивается, в основном за счет мелких форм, а число мегалоцитов значительно, более чем в 17 раз уменьшается, падая с 28% до 1.6%. Это свидетельствует о затухании ранних форм эмбрионального эритропоэза, и уже к 55 суткам две трети эритроидных клеток являются зрелыми, а к 90 суткам гестации они составляют подавляющее большинство (более 95% популяции эритроидных клеток в эмбриогенезе свиней).

Таблица 11.

Цитоморфометрия эритроидных клеток (μm^2) в онтогенезе свиньи ($M \pm SD$)¹.

Возраст зародышей и поросят	Тип клеток	Локализация	Площадь ядра	Площадь клетки
15 сутки	Примитивные эритроидные клетки	Желточный мешок	21.1±3.1	72.7±12.9
15 сутки	Примитивный эритроцит	Желточный мешок	-	58.9±4.2*
25 сутки	Эритроцит	Печень	-	52.1±5.3**
35 сутки	Эритроцит	Печень	-	45.2±3.5†
45 сутки	Эритроцит	Печень, селезенка	-	45.7±4.1†
55 сутки	Эритроцит	Печень, селезенка	-	47.2±5.1†
65 сутки	Эритроцит	Печень, селезенка	-	46.1±2.8†
75 сутки	Эритроцит	Печень, селезенка	-	46.2±4.4†
90 сутки	Эритроцит	Печень, костный мозг	-	45.3±3.3†
Новорожденный поросенок	Эритроцит	Печень, костный мозг	-	44.8±4.0†
Трехмесячный поросенок	Эритроцит	Костный мозг	-	35.4±1.6

Примечание: ¹Мезенхимальные клетки АГМ области в общей популяции эритроидных клеток составляют 0,1%, поэтому в таблице не представлены.

* достоверно ($p < 0.05$) по сравнению с постнатальными эритроцитам

** тенденция ($p < 0.01$) по сравнению с постнатальными эритроцитам

(применялся метод достоверности по u -критерию Вилкоксона-Манна-Уитни)

† общая тенденция к снижению по сравнению с примитивными эритроцитами, число инверсий по u -критерию равно 2.

На раннем этапе эритропоэза в желточном мешке нами было показано, что на 15–25-е сутки (и единичные клетки на 35) некоторая часть мегалобластов (по нашим данным около 2.2%) превращается в безъядерные первичные эритроциты – мегалоциты. Размеры подобных эритроцитов, формирующихся в желточном мешке, значительно превышают размеры не только зрелых эритроцитов костномозгового происхождения, но и эритроцитов, образующихся в ранних эмбриональных эритробластических островках с центральным макрофагом (табл. 11).

Как было сказано выше, начиная с 55-го дня гестации основную массу (более двух третей) эритроидных клеток составляют безъядерные эритроциты, площадь которых на всем протяжении эмбрионального костномозгового эритропоэза не превышает 46.2 ± 5.1 и только у новорожденных уменьшается до 44.8 ± 4.0 , а к трем месяцам доходит до 35.4 ± 1.6 , но и эти различия не достоверны.

При популяционном анализе эритроидных клеток свиньи в эмбриональном периоде, нами выявлена последовательность замены примитивного мезенхимального эритропоэза на эритропоэз в желточном мешке, затем в печени, селезенке и наконец дефинитивный эритропоэз в костном мозге (табл. 12).

Исследование размерных показателей эритроидных клеток эмбрионов свиньи на 15-е, 25-е и 35-е сутки развития выявило, что средние значения площадей всех видов эритробластов, их ядер и цитоплазмы на 15-е и 25-е сутки достоверно отличаются друг от друга, но при этом различия между их размерами на 25-е и 35-е сутки не обнаружены. Аналогичные данные нами получены и по эритроцитам (табл. 13).

Таблица 12.

Популяционный состав эритроидных клеток в эмбриогенезе плода, новорожденной и 30 дневной свиньи (M±SD).

Клетки (%)	Сроки эмбрионального, плодного и постнатального развития (дни)									Новорожд. поросенок	Месячный поросенок
	15	25	35	45	55	65	75	90			
Примитивные эритроидные клетки	98.0±2.1	42.0±3.5	0.1±0.01	0.01±0.0001	0.001±0.0001	-	-	-	-	-	
Примитивный эритроцит	2.0±0.3	0.01±0.001	0.001±0.0001	-	-	-	-	-	-	-	
Базофильный эритробласт	-	6.0±0.8	1.5±0.2	0.2±0.01	0.1±0.01	0.1±0.02	0.01±0.001	-	-	-	
Полихроматофильный эритробласт	-			0.4±0.01	0.3±0.07	0.2±0.02	0.1±0.03	0.1±0.02	0.01±0.001	-	
Ортохромный эритробласт	-	51.0 ² ±3.4	82.6 ² ±4.7	6.2±1.3	5.5±1.0	1.2±0.1	0.1±0.01	0.1±0.01	0.01±0.001	0.001 ¹ ±0.0001	
Ретикулоцит ³	-	-	11.5±1.3	27±3.3	22.8±4.5	11.3±2.8	4.9±1.1	2.6±0.7	1.1±0.4	1.7±0.3	
Эритроцит	-	0.9±0.05	4.3±0.7	66.2±8.1	71.1±10.1	87.2±7.9	94.9±9.3	97.2±4.6	98.9±1.3	98.3±1.8	

Примечание:

¹ наличие ортохромных эритробластов в крови 30 дневных поросят отмечается лишь у отдельных животных² отличие полихроматофильных и ортохромных эритробластов на данном этапе затруднительно³ на 25 сутки внутриутробного развития свиней ретикулоциты и ортохромные эритробласты отличаются лишь по количеству гемоглобина

Таблица 13.

Изменение размерных показателей эритроидных клеток на ранних сроках эмбриогенеза свиньи (M±SD)

Срок гестации												
Тип клетки	15				25				35			
	А	Б	В	Г	А	Б	В	Г	А	Б	В	Г
Бласты												
Мелкие	54.6±0.9	18.0±1.6	36.6±1.2	0.5	36.5±2.0	12.3±0.6	24.2±1.8	0.5	36.1±2.0	10.9±3.5	25.2±2.0	0.4
Крупные	83.3±1.7	22.9±0.5	60.4±1.5*	0.4	59.8±1.4	16.8±0.9	43.1±1.5*	0.4	62.1±7.5	14.3±0.6	47.8±7.3*	0.3
Суммарный показатель	80.8±1.7	22.9±0.4	58.3±1.5	0.4	48.4±2.2	14.6±0.7	32.8±1.9	0.4	49.1±4.6	12.6±0.6	36.5±4.0	0.35
Эритроциты												
Мелкие	54.1±1.2	15.2±2.7	38.9±0.8	0.4	35.8±1.7	11.3±0.6	24.5±1.5	0.4	30.0±4.6	8.2±2.8	21.8±3.8	0.3
Крупные	86.1±2.3	23.2±1.6	62.9±2.1*	0.4	60.9±2.5	17.8±1.9	41.1±4.1*	0.4	61.7±5.3	11.7±0.7	50.0±5.8*	0.3
Суммарный показатель	82.6±2.3	22.4±0.6	60.2±2.0	0.4	41.8±2.2	13.3±0.9	28.5±1.8	0.4	45.8±4.6	10.0±0.6	35.9±4.2	0.3

Примечание: А;Б;В;Г- соответственно клетка; ядро; цитоплазма; ядерно-цитоплазм. отношению. *- достоверно ($p < 0,05$) по сравнению с мелкими клетками (применялся метод достоверности по статистическому критерию *t-Student*).

Важно отметить, что ядерно-плазменные отношения у всех видов эритроидных клеток с возрастом уменьшаются, но при этом у мелких эритробластов и эритроцитов на 15-е и 25-е сутки они достигают 0.5, а у крупных их аналогов не превышают 0.4. Однако на 35-е сутки ядерно-плазменные отношения эритроидных клеток свиней падают, доходя до 0.3 и держатся на этом уровне до 55 суток гестации (таблица 13). В дальнейшем с увеличением срока гестации площадь ядер эритроцитов вследствие незначительного их количества не измерялась.

При исследовании содержания гемоглобина в эритроидных клетках в онтогенезе свиньи видно, что примитивные эритробласты и эритроциты на 15 сутки эмбриогенеза содержат несколько больше гемоглобина, чем примитивные их аналоги на 25 сутки внутриутробного развития (табл. 14). Когда к желточному кроветворению присоединяется печеночное кроветворение, количество гемоглобина на клетку, как в ранних, так и в поздних эритробластах и эритроцитах снижается более чем в 2 раза. Важно заметить, что в дальнейшем с увеличением периода гестации гемоглобин определялся только в эритроцитах, в которых его количество, начиная с 35-го дня гестации оставалось практически неизменным. Надо заметить, что хотя примитивные гемопоэтические клетки содержат в два раза больше гемоглобина чем зрелые эритроциты, однако их площадь превышает площадь зрелых клеток также более чем в два раза, а следовательно их объем превышает объем зрелых эритроцитов более чем в три раза не учитывая имеющееся ядро.

Следовательно насыщенность гемоглобином примитивных гемопоэтических клеток, примитивных эритроцитов и зрелых (постнатальных) эритроцитов приблизительно одинаковая. Таким образом, полученные нами данные по динамике изменения содержания гемоглобина в эритроидных клетках на разных сроках развития эмбриона свиньи, выявили наибольшее содержание гемоглобина на 15-е сутки эмбриогенеза, в то время как уже на 25-е и 35-е сутки содержание гемоглобина достоверно уменьшается, возможно, из-за его затухания в связи с резким уменьшением их значимости. С увеличением возраста эмбриона содержание гемоглобина в клетках имеет не выраженную тенденцию к снижению.

Таблица 14.

Содержание гемоглобина (пг) в эритроидных клетках в онтогенезе свиньи (M±SD)¹.

Возраст эмбрионов и поросят	Тип клеток	Локализация	Содержание гемоглобина
15 сутки	Примитивный эритробласт	Желточный мешок	40.2±7.4*
15 сутки	Примитивный эритроцит	Желточный мешок	33.7±9.0*
25 сутки	Первичный эритробласт	Желточный мешок	33.4±5.1*
25 сутки	Первичный эритроцит	Желточный мешок	41.4±5.2*
25 сутки	Ранний эритробласт	Печень	14.9±4.1
25 сутки	Поздний эритробласт	Печень	15.5±3.2
25 сутки	Эритроцит	Печень	20.3±0.5**
35 сутки	Эритроцит	Печень	21.1±1.2**
45 сутки	Эритроцит	Печень, селезенка	19.9±1.1
55 сутки	Эритроцит	Печень, селезенка	19.2±1.4
65 сутки	Эритроцит	Печень, селезенка	18.7±1.0
75 сутки	Эритроцит	Печень, селезенка	19.1±0.9
90 сутки	Эритроцит	Печень, костный мозг	18.9±1.5
Новорожд. Поросянок	Эритроцит	Печень, костный мозг	18.6±0.8
Трехмесячный поросенок	Эритроцит	Костный мозг	18.2±2.1

Примечание: ¹ Мезенхимальные клетки АГМ области в общей популяции эритроидных клеток составляют 0,1%, поэтому в таблице не представлены.

* достоверно ($p < 0.05$) по сравнению с постнатальными эритроцитам (применялся метод достоверности по u -критерию Вилкоксона-Манна-Уитни)

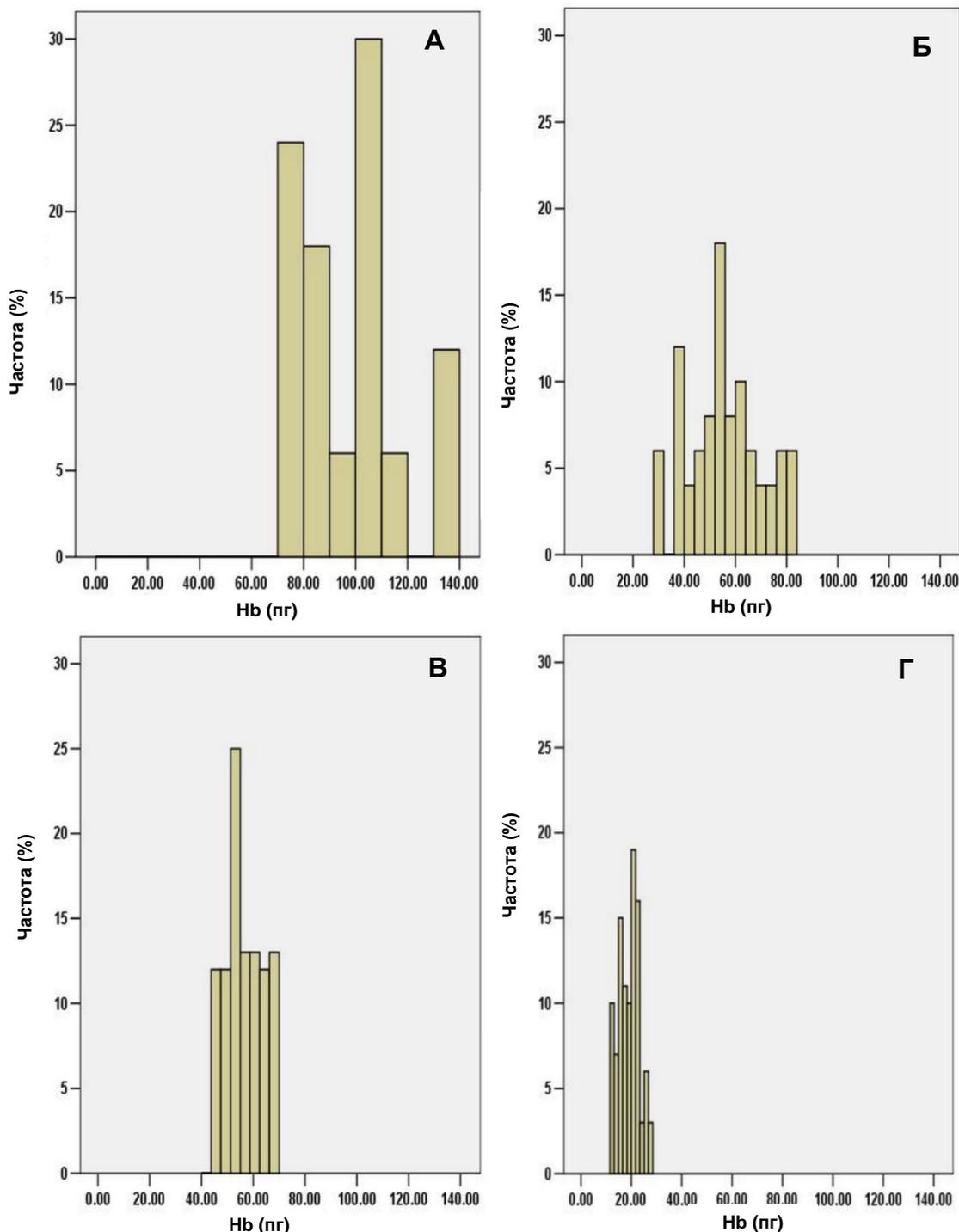
** общая по сравнению со зрелыми эритроцитами, число инверсий по u - критерию равно 2-3 ($p < 0.1$).

Наибольшее содержание гемоглобина приходится на ранние, примитивные эритроидные клетки, образующиеся в желточном мешке (график 15А). Надо заметить, что эта популяция достаточно гетерогенная, в ней выделяются клетки со значительно

большим содержанием гемоглобина. Возможно это выявленные нами ранее гипертетраплоидные клетки, что по данным литературы у птиц способствует повышенному синтезу гемоглобина [Каралова Е.М., 2012].

График 15.

Распределение основных эритроидных клеток эмбриона свиньи и зрелых эритроцитов свиньи по содержанию гемоглобина (Hb, *n*₂)



А. Примитивная эритроидная клетка; Б. Ранний ядерный эмбриональный эритроцит;
В. Поздний эмбриональный эритроцит; Г. Зрелые эритроциты

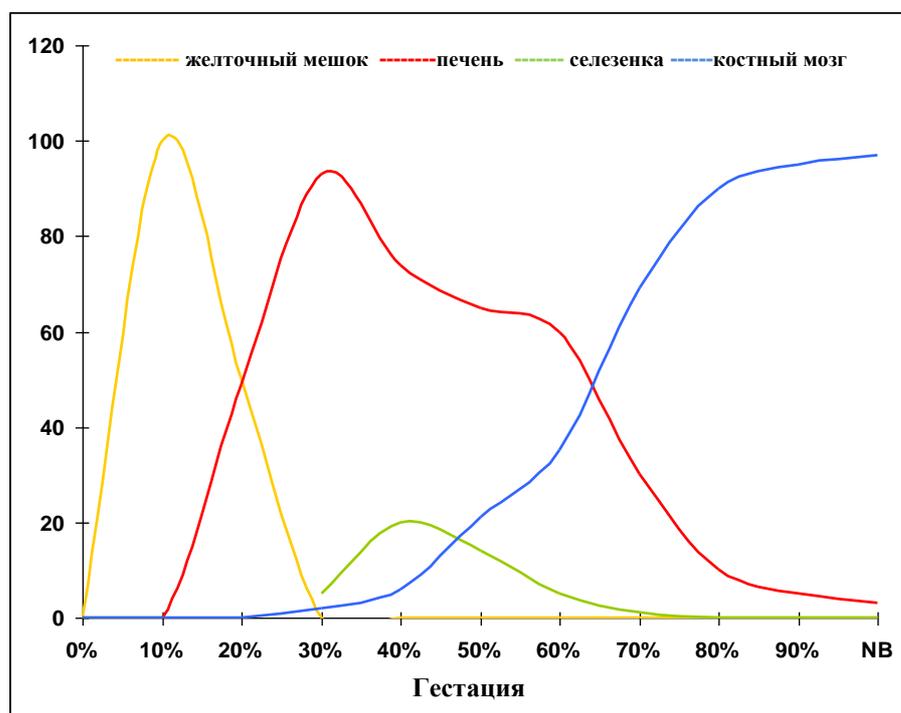
На более поздних сроках онтогенеза такое гетерогенное распределение гемоглобина исчезает, и соответствует нормальному вариационному ряду. Необходимо добавить, что повышенное содержание гемоглобина не приводит к более эффективному транспорту кислорода из-за малого (по сравнению с более поздними сроками) количества клеток, а из-за снижения суммарной площади замедляется обмен кислорода в тканях, поэтому такой тип эритропоэза возможен лишь в малом по объему зародыше.

В целом надо отметить, что исследования примитивного эритропоэза у свиней немногочисленны. Имеются лишь отдельные работы на данную тематику. Так, [Liwska J., Grabinski-Baranowski A.J., 1994], при изучении эритропоэза в желточном мешке зародыша свиньи показали, что передача гемопоэтических функций от желточного мешка к печени происходит к 27 суткам эмбрионального развития, а также функционирования гемопоэза в желточном мешке до 51 дня развития эмбриона свиньи. Наши данные указывают на более ранние сроки (25 сутки – совместное функционирование двух центров кроветворения – в желточном мешке и в печени), и почти полное угасание гемопоэза в желточном мешке после 35 суток развития эмбриона [Pearson P.L. et al., 1998].

Подводя итоги изучения эмбрионального эритропоэза у свиней, нами была суммирована и распределена по времени, иными словами дана временная локализация кроветворных тканей и их доля в общем эритропоэзе свиньи во время внутриутробного развития (график 16).

Приведенная нами временная локализация эритропоэза во время внутриутробного развития свиньи показывает, что в первый триместр беременности основным эритропоэтическим органом является желточный мешок, затем эритропоэз перемещается в печень, достигая своего пика к 45-65 суткам гестации, оставаясь активной до момента рождения. В середине второго триместра беременности эритропоэз возникает и в селезенке, которая является одним из основных органов лимфопоэза и играет малозначимую роль в эритропоэзе, и объем эритропоэза в селезенке значительно уступает таковому в печени.

**Временная локализация кроветворных тканей во время
внутриутробного развития свиньи¹.**



Примечание:

¹Мезенхимальные клетки АГМ области в общей популяции эритроидных клеток составляют 0,1%, поэтому на графике не представлены.

По оси абсцисс - доля участия органа в кроветворении (%),

По оси ординат - срок внутриутробного развития, выраженный в проценте от беременности (вся беременность усреднена в 115 дней;

NB – новорожденный.

По оси ординат – возраст эмбриона (сут.)

Примерно с середины гестации, эритропоэз возникает в костном мозге, который отличается от предшествующих типов локализации прежде всего тем, что здесь доминирует образование миелоидных клеток. Однако, уровень эритропоэза в костном мозге увеличивается со сроком гестации и остается единственным миелопоэтическим органом в постнатальном периоде.

3.10. Сравнительная характеристика раннего эритропоза млекопитающих

Для того, чтобы выяснить общие и отличительные стороны раннего развития эритроидных клеток в эмбриогенезе различных млекопитающих и наше понимание того, как эти клетки развиваются и дифференцируются на протяжении онтогенеза млекопитающих, нами было проведено исследование раннего эритропоза крыс и его сравнение с эритропозом свиньи. При желточном кроветворении на 12-й стадии развития эмбрионов крыс (данные по стадиям эмбриогенеза млекопитающих см. глава 2) вся популяция первичных эритроидных клеток представлена макробластами. Однако, начиная с 13-й стадии эмбриогенеза в желточном кроветворении крыс появляются эритробластические формы, среди которых около 50,8% составляют макроэритроидные клетки и только около 6,8% приходится на микроэритроидные формы, а число появившихся нормоэритроидных клеток доходит до 44,7% (табл. 15). Постепенно с началом печеночного кроветворения, количество макробластов уменьшается, а количество нормоцитов увеличивается. Таким образом, по мере развития эмбрионов крыс наблюдается та же тенденция, как в эмбриогенезе свиней, что, вероятно, связано с затуханием по мере развития эмбриона ангиобластического периода кроветворения [Каралова Е.М. и соавтр., 2017].

Таблица 15.

Изменение состава популяции эритроидных клеток (%) в процессе первичного эритропоза крыс (M±SD).

Эритроидные клетки в эмбриогенезе крыс	Различных фракций эритроидных клеток крыс		
	12 стадия	13 стадия	17 стадия.
Макробласты	94.4±3.5	7.2±0.7	3.1±0.5
Нормобласты	-	17.8±1.4*	13.2±1.4*
Микробласты	-	3.6±0.3*	0.8±0.05
Макроциты	-	43.6±5.1*	22.9±3.1*
Нормоциты	-	26.9±2.6*	53.9±4.7*
Микроциты	-	3.2±0.3*	0.8±0.1

Примечание:

**достоверно ($p < 0.05$) по сравнению с 12 стадией (применялся метод достоверности по статистическому критерию *t-Student*)*

В дальнейшем, к печеночному эритропозу у крыс присоединяется эмбриональное костномозговое кроветворение и уже на 17-й стадии эмбриогенеза вследствие затухания

печеночного кроветворения количество микроэритроидных клеток уменьшается до 1,6% от всей популяции, число нормоэритроидных клеток достигает 67%, а число макробластов резко падает, тогда как в начале первичного эритропоэза они составляли подавляющее большинство клеток крови, достигая 95% популяции. При этом значительно увеличивается количество зрелых эритроцитарных форм, составляя около 77,6% популяции всех эритроидных форм. Таким образом, можно предположить, что имеющий место микроцитоз в эмбриональном эритропоэзе крыс незначителен, в то время как, макроцитоз играет важную роль в первичном эритропоэзе крыс.

С началом желточного кроветворения (13 стадия эмбриогенеза), размеры проэритробластов в среднем уменьшаются на 25%, но в дальнейшем на всем протяжении исследования размеры проэритробластов не меняются, а размеры бластных форм в процессе эмбрионального развития недостоверно уменьшаются за исключением нормальных бластов, размеры которых остаются без изменений. Важно заметить, что размеры макробластов, количество которых к 17-й стадии эмбриогенеза уменьшается до 3%, уменьшаются в среднем на 50% (табл. 16).

Таблица 16.

Изменение размеров эритроидных клеток (мкм²) в процессе первичного эритропоэза крыс (M±SD).

Эритроидные клетки в эмбриогенезе крыс	Различные фракции эритроидных клеток крыс.		
	12 стадия	13 стадия	17 стадия
Проэритробласты	70.0±6.5	56.3±18.2	52.4±17.5
Макробласты	86.2±7.9	67.1±13.3	44.3±4.2**
Нормобласты	-	38.0±3.2*	35.7±4.6*
Микробласты	-	26.5±2.2*	21.9±1.9*
Макроциты	-	54.5±4.6*	41.6±4.8*
Нормоциты	-	37.7±3.5*	34.7±3.4*
Микроциты	-	25.6±1.8*	18.4±1.5*

*Примечание: *достоверно выше, по сравнению с 12 стадией (p<0.05)*

***достоверно ниже, по сравнению с 12 стадией (p<0.05) (применялся метод достоверности по статистическому критерию t-Student)*

Исследование динамики изменения содержания гемоглобина выявило недостоверное уменьшение его содержания во всех эритроидных клетках в процессе эмбрионального развития крыс, за исключением нормоцитов (табл. 17).

Таблица 17

Динамика содержания гемоглобина (пг) в эритроидных клетках первичного эритропоэза крыс в процессе их дифференцировки (M±SD).

Эритроидные клетки в эмбриогенезе крыс	Содержание гемоглобина в эритроидных клетках крыс (пг).			
	12 стадия	13 стадия	13-14-ая стадия.	17 стадия
Проэритробласты	32.1±0.9	30.1±1.1	19.5±0.7*	20.1±0.9*
Макробласты	45.4±4.1	43.4±6.2	41.0±4.1	34.9±4.1*
Нормобласты		13.9±1.2*	31.6±3.2*	21.9±1.5*
Микробласты		12.1±0.3*	11.3±1.4*	12.4±1.5*
Макроциты		64.9±6.7*	71.4±3.9	56.8±3.5*
Нормоциты		43.8±6.0*	46.7±1.9*	46.7±1.7*
Микроциты		23.3±4.0*	17.2±1.9*	16.8±1.7*

*Примечание: *достоверно ($p < 0.05$) по сравнению с 12 стадией (применялся метод достоверности по статистическому критерию t -Student)*

Как было показано ранее, начиная с 13-й стадии эмбриогенеза крысят, около 50.8% эмбриональных клеток представлены макроэритроидными клетками, размеры которых в полтора раза больше размеров нормоэритроидных клеток и в 2 раза крупнее микроцитов. При этом содержание гемоглобина в макроэритроидных клетках соответственно в среднем на 50% больше, чем в нормоэритроидных клетках и в 3 раза выше чем в микроэритроидных клетках (табл. 18).

Таблица 18

Содержание гемоглобина (пг) в эритроидных клетках в процессе их дифференцировки на 13-й стадии эмбриогенеза крыс (M±SD).

Типы клеток	Бласты		Эритроциты	
	Размеры клеток	Нб	Размеры клеток	Нб
Микробласты	26.5±2.2	12.1±0.3	25.6±1.8	23.3±4.0
Нормобласты	38±3.2	13.9±1.2	37.7±3.5*	43.8±6.0**
Макробласты	67.1±13.3*	43.4±6.2*	54.5±4.6*	64.9±6.7*

*Примечание: *достоверно ($p < 0.05$) по сравнению с микробластами
**тенденция ($p < 0.01$) (применялся метод достоверности по статистическому критерию t -Student)*

Результаты проведенного анализа содержания ДНК в разных типах эритроидных клеток на 13-14-ой стадиях эмбриогенеза крыс, показали, что ранние, средние и поздние эритробласты представлены клетками в G₁, S и G₂ - стадиях митотического цикла (табл. 19; график 17). При этом, основное количество 3с и 4с клеток (более 70%) приходится на ранние эритробласты, в то время как в средних и поздних эритробластах диплоидные клетки составляют более 70% и содержание суммарного белка в средних эритробластах примерно на 25%, а в поздних уже почти в два раза выше, чем в диплоидных аналогах ранних эритробластов. Как указывалось ранее [Корвин-Павловская Е.Г. и соавтр., 1978], в виду того, что показатель «суммарный белок» отражает, в основном, содержание гемоглобина в эритробластах, можно считать, что данные, представленные в табл. 19, отражают динамику изменений содержания гемоглобина в эритробластах в процессе дифференцировки.

Таблица 19.

Содержание ДНК и суммарного белка на разных стадиях развития эритробластов на 13-14 стадии эмбриогенеза крыс (M±SD).

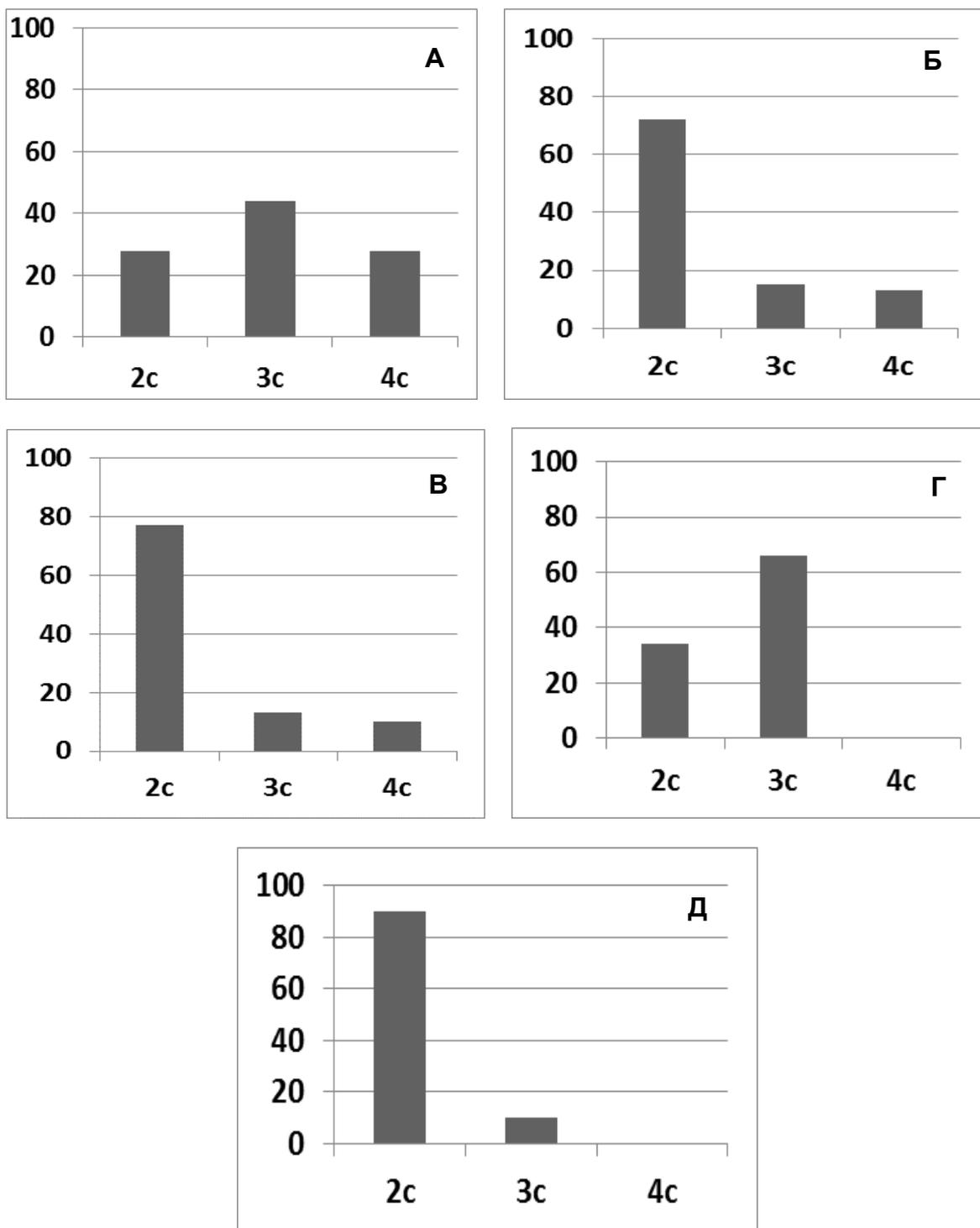
Стадии развития	Классы плоидности	Число клеток (%)	Суммарный белок
Ранние эритробласты	2с	28	28.2±1.4
	3с	44	41.1±4.0
	4с	28	52.1±3.8
Средние эритробласты	2с	72	35.1±3.9
	3с	15	56.1±5.8
	4с	13	75.1±8.9*
Поздние эритробласты	2с	77	54.2±2.8
	3с	13	68.3±9.5**
	4с	10	81.2±9.3*
Средние бласты с доплн. ядром	2с	34	37.7±4.2
	3с	66	50.0±7.1
Поздние бласты с доплн. ядром	2с	90	56.3±3.8
	3с	10	76.3±9.5**
	4с	-	-
Двухядерные бласты	4с		90.2±11.1*
Митозы	4с		

*Примечание: * достоверно по сравнению с ранними эритробластами (p<0.05-p<0.01); **тенденция по сравнению с тетраплоидными ранними эритробластами (p<0.1); (применялся метод достоверности по статистическому критерию t-Student)*

Интересный факт нами был обнаружен на этой же стадии развития эритроидных клеток. Оказалось, что среди средних и поздних эритробластов имеется небольшой (около 3%) клеток с дополнительными ядрами. Наибольшее их количество встречается на 13-й и 13-14-й стадиях, а затем их число резко уменьшается.

Профотометрировав отдельно основное и дополнительное ядра, выявили, что, если около 70% средних эритробластов в основном и дополнительном ядрах в сумме содержится диплоидное количество ДНК, то уже на стадии позднего эритробласта почти все клетки с дополнительными ядрами (около 90%) диплоидны по содержанию ДНК, а количество белка в них не превышает его содержание в диплоидных аналогах поздних эритробластов. Это свидетельствует о том, что в первичном эритропоэзе крыс, в основном, происходит не дополнительный синтез ДНК в ядрах с соответственным увеличением содержания суммарного гемоглобина, как наблюдается в первичном эритропоэзе птиц [Каралова Е.М. и соавтр., 1985, Gazaryan K.G. et al., 1987], а фрагментация ядер и только в 10% клеток достоверно повышается суммарное содержание ДНК за счет дополнительного синтеза ДНК в ядрах эритробластов, соответственно чему в них увеличивается количество суммарного белка (табл. 19). В этой же таблице представлены данные по содержанию ДНК в митозах и в двуядерных эритробластах. Последние в незначительном количестве встречаются в первичном эритропоэзе млекопитающих. Они четко содержат 4с ДНК и ни в одном случае в них не были обнаружены дополнительные ядра, как они были выявлены на различных стадиях митоза в первичном эритропоэзе птиц [Каралова Е.М., 2012]. Это явление подтверждает наше предположение об отсутствии в первичном эритропоэзе крыс дополнительного синтеза ДНК в значительной части эритроидных клеток с аксессуарными ядрами и его значимости для первичного эритропоэза млекопитающих, однако наличие этого фактора даже в незначительной части поздних эритробластов с соответствующим увеличением в них суммарного белка говорит о существовании данного явления в эволюции (график 17).

Распределение ядер эритроидных клеток крыс по классам плоидности



А. Ранние эритробласты;

Б. Средние эритробласты;

В. Поздние эритробласты;

Г. Средние эритробласты с дополнительным ядром;

Д. Поздние эритробласты с дополнительным ядром

Таким образом, нами показано отличие эритропоэза свиней от эритропоэза крыс. На ранних стадиях онтогенетического развития почти полное отсутствие синтеза ДНК в незрелых эритроидных клетках крыс, по нашему мнению, является следствием более интенсивного эритропоэза в физиологическом развитии свиней. У крыс также отсутствует гипертетраплоидная популяция гемопозитических клеток, что подтверждает вышеизложенное предположение, в пользу которого также говорят и более низкие значения содержания гемоглобина в эритроидных клетках раннего эритропоэза крыс по сравнению с аналогичными показателями у свиней.

ГЛАВА 4. МОРФОЛОГИЯ И РАЗВИТИЕ КЛЕТОК НОРМОБЛАСТИЧЕСКОГО ЭРИТРОПОЭЗА В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ СВИНЬИ

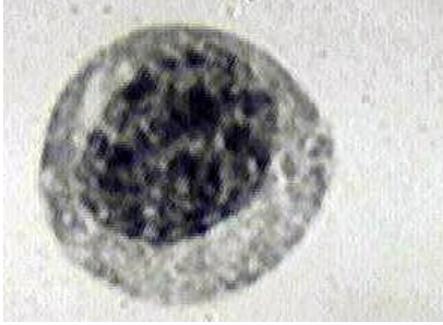
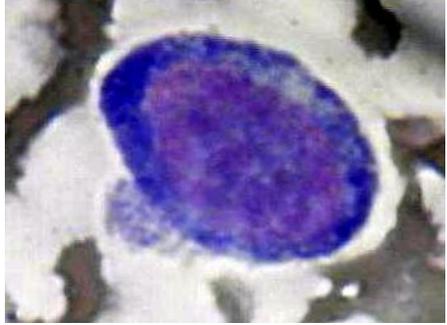
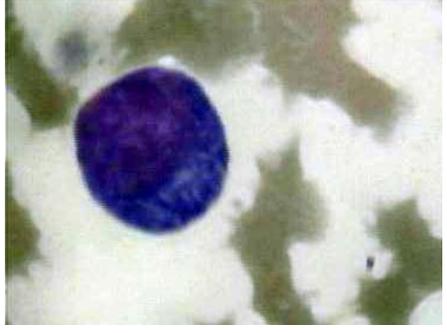
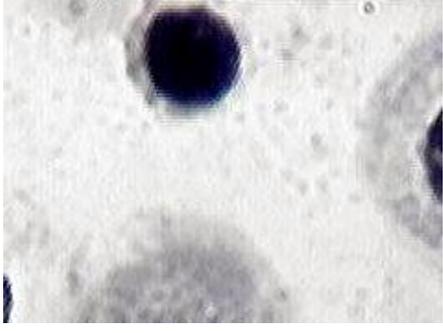
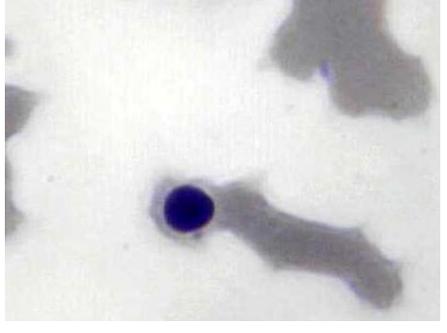
В постнатальном онтогенезе свиней кроветворение осуществляется главным образом в костном мозге губчатого вещества плоских костей (прежде всего, кости таза, грудина, тела позвонков, череп, ребра), т.к. в трубчатых костях кроветворение для половозрелого этапа развития не характерно из-за ожирения.

Морфологические характеристики стволовых клеток родоначальников кроветворения крайне невыразительны, что объясняется незрелостью клеток. У млекопитающих это выражается в высоком ядерно-цитоплазматическом соотношении, гомогенности хроматина и отсутствии четких признаков дифференцировки. Морфологически эти клетки выглядят как недифференцированные бласты. Ядерно-цитоплазматическое соотношение, на сегодняшний день, в основном используется для определения степени трансформированности клеток, однако оно также является важной морфологической характеристикой позволяющей оценить уровень метаболизма. В лимфоидной популяции оно также позволяет выявить степень активации клеток [Petrzilka G.E., Schroeder H.E., 1979]. Согласно авторам, при активации лимфоцитов это соотношение снижается – иными словами увеличивается доля цитоплазмы.

Ядерно-цитоплазматическое соотношение имеет меньшее значение при анализе эритроидной популяции, однако для последней очень важно содержание и/или концентрация РНК в цитоплазме. По мере созревания количество РНК в цитоплазме снижается, замещаясь белком (гемоглобином). Также важно отметить, что транскрипционная активность ядра в клетках эритроидной популяции, по мере созревания снижается, вследствие чего ядро становится более компактным и плотным (возрастает гетерохроматизация). Для лучшей оценки этих процессов, помимо общепринятой окраски по Гимза, нами использовалась количественная окраска нуклеиновых кислот - галлоцианин-хромовыми квасцами (см. глава 2). Данные представлены на таблице 20.

Таблица 20.

Клетки-предшественники нормобластического эритропоэза половозрелой свиньи

Клетки	Окраска галлоцианин-хромовыми квасцами	Окраска по Гимза
Проэритробласт, увеличение 1200X		
Базофильный эритробласт, увеличение 1200X		
Полихроматофильный эритробласт, увеличение 1200X		
Оксифильный эритробласт, увеличение 1200X		

Клетки-предшественники нормобластического эритропоэза прогрессивно уменьшаются в размерах, по мере созревания, а оксифильные эритробласты отличаются по своим размерам от эритроцитов свиньи незначительно (табл. 21).

Таблица 21.

Размер эритроидных клеток свиней (M±SD).

Клетки	Диаметр / μm
Проэритробласты	19.5±2.4
Крупные базофильные эритробласты	12.5±1.0
Малые базофильные эритробласты	8.9±0.5
Полихроматофильные эритробласты	8.5±0.5
Оксифильные эритробласты	8.1±0.2
Зрелый эритроцит	6.15±0.2

Таблица 22.

Эритроциты периферической крови здоровых половозрелых свиней

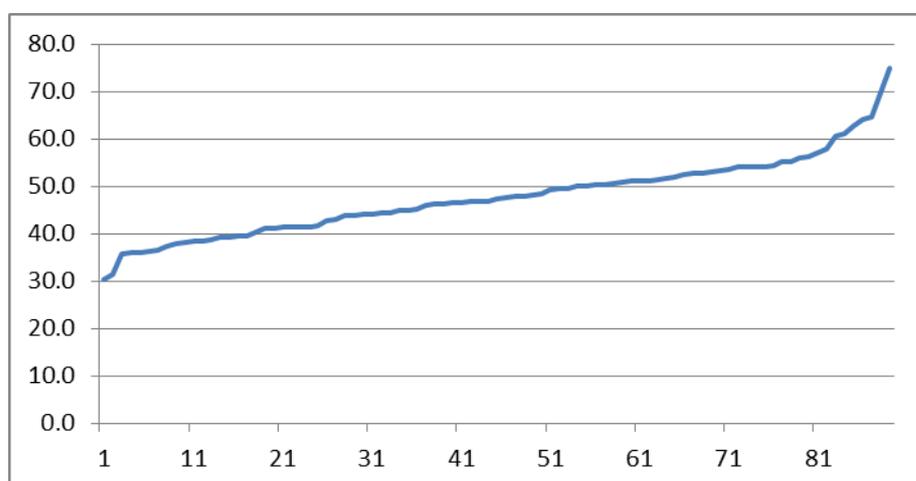
Соотношение различных типов эритроцитов, (%)

Нормоциты	Макроциты	Микроциты	Патологические эритроциты
85.5	8.7	5.8	-

Основная масса эритроцитов в периферической крови у здоровых половозрелых свиней представлена нормоцитами, (почти 90%) (табл. 22, граф. 18).

График 18.

Распределение эритроцитов здоровых половозрелых свиней по площади (μm^2).



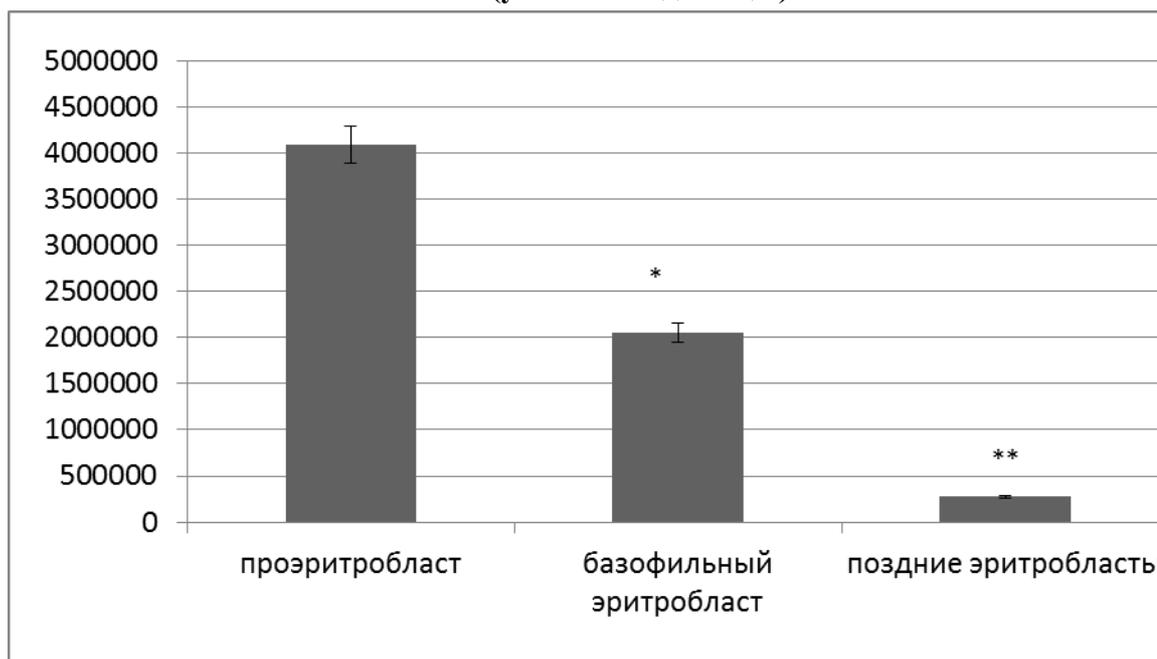
Вертикальная ось – площадь эритроцитов;

Горизонтальная ось распределение эритроцитов в %.

При исследовании содержания количества РНК в эритроидных клетках свиньи выявлено, что РНК в зрелых эритроидных клетках (эритроцитах) чрезвычайно мало. Вследствие этого нами приведены данные по этому показателю в клетках-предшественниках нормобластического эритропоэза свиней. При этом, по мере созревания содержание РНК в клетках достоверно снижается (граф. 19).

График 19.

Содержанию РНК в клетках-предшественниках нормобластического эритропоэза свиней (условные единицы).

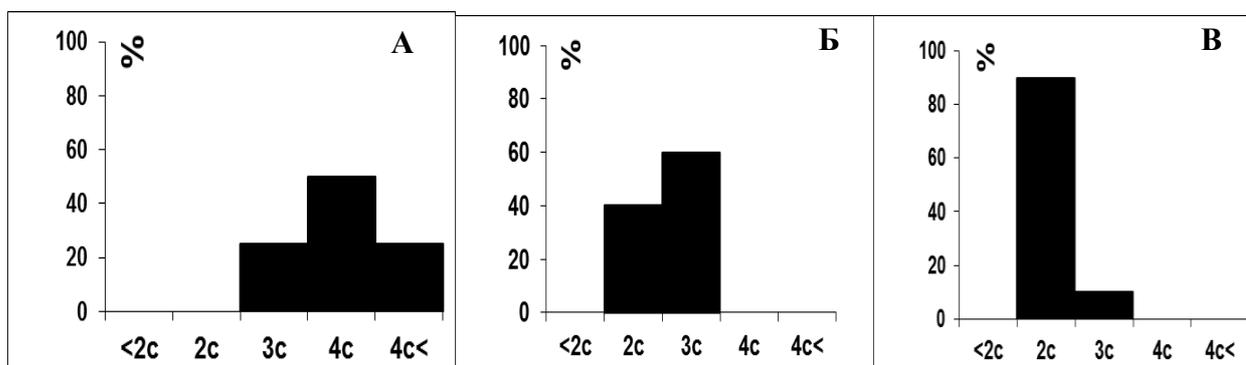


*Примечание: *достоверно ниже по сравнению с проэритробластами ($p < 0.05$);
 ** достоверно ниже по сравнению с базофильными эритробластами ($p < 0.01$)
 (применялся метод достоверности по статистическому критерию *t-Student*)*

При определении содержания ДНК в клетках-предшественниках нормобластического эритропоэза свиней выявлено, что около 25% популяции проэритробластов у свиней полиплоидны, это является результатом блока клеток в фазе G_2 митотического цикла, а в базофильных и полихроматофильных эритробластах наблюдается синтез ДНК, что свидетельствует об их способности к пролиферации (граф. 20).

Ядра ортохромных эритробластов костного мозга в наших данных отсутствуют так, как из данных литературы известно, что в норме в ядрах ортохромных эритробластов всегда содержится диплоидное количество ДНК. У свиней данный показатель также диплоиден.

Распределение ядер эритроидных клеток костного мозга половозрелых свиней по классам плоидности



А. Распределение ядер проэритробластов костного мозга

Б. Распределение ядер базофильных эритробластов костного мозга

В. Распределение ядер полихроматофильных эритробластов костного мозга

Таким образом, полученные нами данные о постнатальных клетках эритроидного ряда свиней, показали идентичность их развития и сходную морфологию с аналогичными клетками других млекопитающих [Жуков А.П. и соавт., 2016]. Надо заметить, что эритроциты и клетки-предшественники нормобластического эритропоэза свиней меньше по размерам соответствующих клеток человека.

ГЛАВА 5. РЕГУЛЯЦИЯ ЭМБРИОНАЛЬНОГО ЭРИТРОПОЭЗА СВИНЕЙ МАТЕРИНСКИМИ КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩИМИ ФАКТОРАМИ

Макрофагам отводится значительная роль в регуляции функциональной активности гемопоэтических клеток. Известна ведущая роль макрофагов в создании эритробластических островков, обеспечивающих пролиферацию и дифференцировку эритроидных клеток. В эмбриональном периоде становление эритробластических островков приходится на начало печеночного этапа развития эритропоэза [Ferkowicz M.J., Yoder M.C, 2005].

Факторы, поддерживающие гемопоэз называются колониестимулирующими факторам. Продукция клеток моноцитарно-макрофагального ряда находится под контролем целой группы ростовых факторов: интерлейкина-3 и колониестимулирующие факторы стимулируют митотическую активность предшественников моноцитов. Для пролиферации и дифференцировки макрофагов наибольшее значение имеют гранулоцит-макрофаг колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) и макрофаг колониестимулирующий фактор (М-КСФ). Интерлейкин-3 является поликолониестимулирующим фактором, который стимулирует все ростки кроветворения, гранулоцит-макрофаг колониестимулирующий фактор стимулирует продукцию гранулоцитов и макрофагов, а также активизирует функции макрофагов. Представляется важным исследование именно ГМ-КСФ и М-КСФ, которые в отличие от интерлейкина-3 являются специфичными факторами, воздействующими на пролиферацию и специализацию макрофагов, что и послужило причиной нашего интереса. Специфическим фактором роста для мононуклеарных фагоцитов считается М-КСФ, продуцентами которого могут служить стромальные клетки костного мозга, моноциты, тканевые макрофаги, Т-хелперы, фибробласты, эпителиальные клетки эндометрия и некоторые другие [Rahmati M. et al., 2015; Nishijima I. et al, 1997].

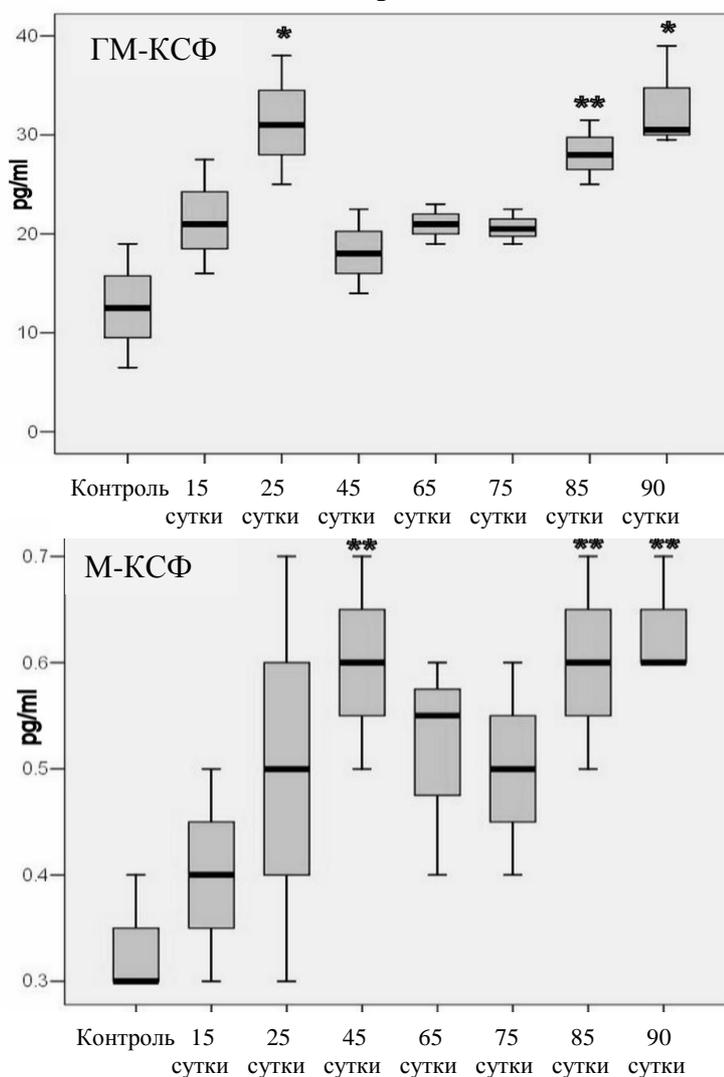
Гранулоцит-макрофаг колониестимулирующий фактор - уникальный белок семейства цитокинов, принимающий участие в обеспечении гемопоэтического гомеостаза, а также стимулирует дифференцировку клеток миелоидного ряда. Он влияет на функцию макрофагов и нейтрофилов, в том числе на фагоцитоз, миграцию и метаболизм [Burgess A.W., Metcalf D., 1980, Hubel K. et al., 2002]. Гранулоцит-макрофаг колониестимулирующий фактор во время беременности, экспрессируется в половых

путях он усиливает пролиферацию клеток, активирует развитие эмбриона, образования бластоцисты, и имплантации эмбриона.

При измерении сывороточных уровней колониестимулирующих факторов в крови свиноматок во время беременности, нами выявлено достоверное повышение уровня гранулоцит-макрофаг колониестимулирующего фактора на 25 и 90 сутки гестации, а 85 сутки отмечена выраженная тенденция к подъему. Уровень макрофаг колониестимулирующего фактора не выявил достоверных изменений в сыворотке свиноматок, однако нами была выявлена выраженная тенденция к росту на 45, 85 и 90 сутки внутриутробного развития (граф. 21).

График 21.

Уровни колониестимулирующих факторов в крови беременных свиноматок в динамике беременности.



*Примечание: *достоверно по сравнению с контролем ($p < 0.05$)*

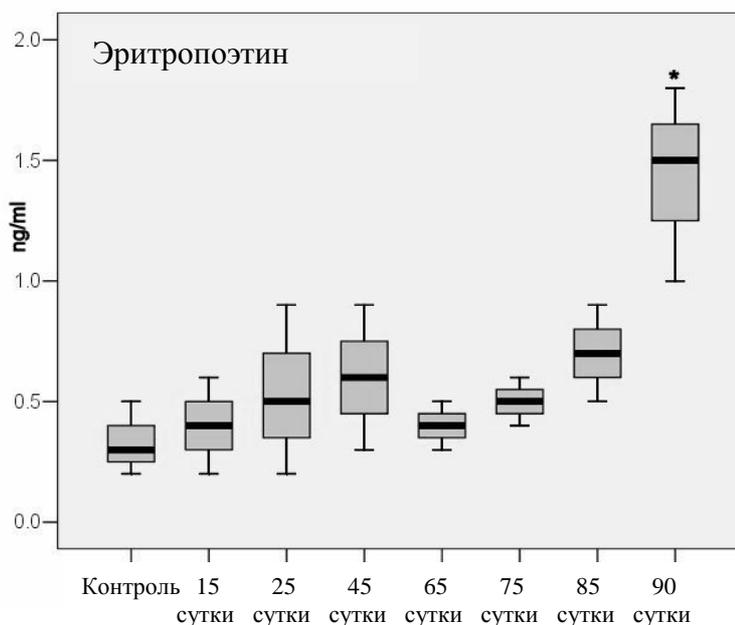
***тенденция по сравнению с контролем ($p < 0.1$)*

(применялся метод достоверности по статистическому критерию t-Student)

В отличие от уровней колониестимулирующих факторов, уровень эритропоэтина оставался практически неизменным, почти до конца гестации, когда на 90е сутки внутриутробного развития нами зафиксирован достоверный рост содержания эритропоэтина в сыворотках беременных свиной (граф. 22).

График 22

Уровень эритропоэтина в крови беременных свиноматок в динамике беременности.



*Примечание: *достоверно по сравнению с контролем ($p < 0.01$) (применялся метод достоверности по статистическому критерию t-Student)*

Роль макрофагов в эритропоэзе сложно переоценить, несмотря на это эмбриональные макрофаги млекопитающих остаются сравнительно малоизученными, а эмбриональное развитие макрофагов свиной практически не изучено. При этом, условия и механизмы дифференцировки макрофагов эмбриона млекопитающих также не вполне ясны.

Основные факторы, способствующие дифференцировке макрофагов, являются в гранулоцит-макрофаг колониестимулирующий фактор и макрофаг колониестимулирующий фактор, вырабатываемые в организме матери, имеют важное значение для имплантации, плацентации и развития эмбриона у ряда млекопитающих, в том числе и у человека [Rahmati M. et al., 2015]. Однако, влияние материнских ГМ-КСФ и М-КСФ на созревание и дифференцировку макрофагов эритробластических островков печени и переходу к нормобластическому эритропоэзу у эмбриона свиной не была изучена.

Ранее нами было показано, что у свиной приблизительно к 25 суткам развития эмбриона свиной в сосудах эмбриона появляются клетки двух типов: мегалобласты

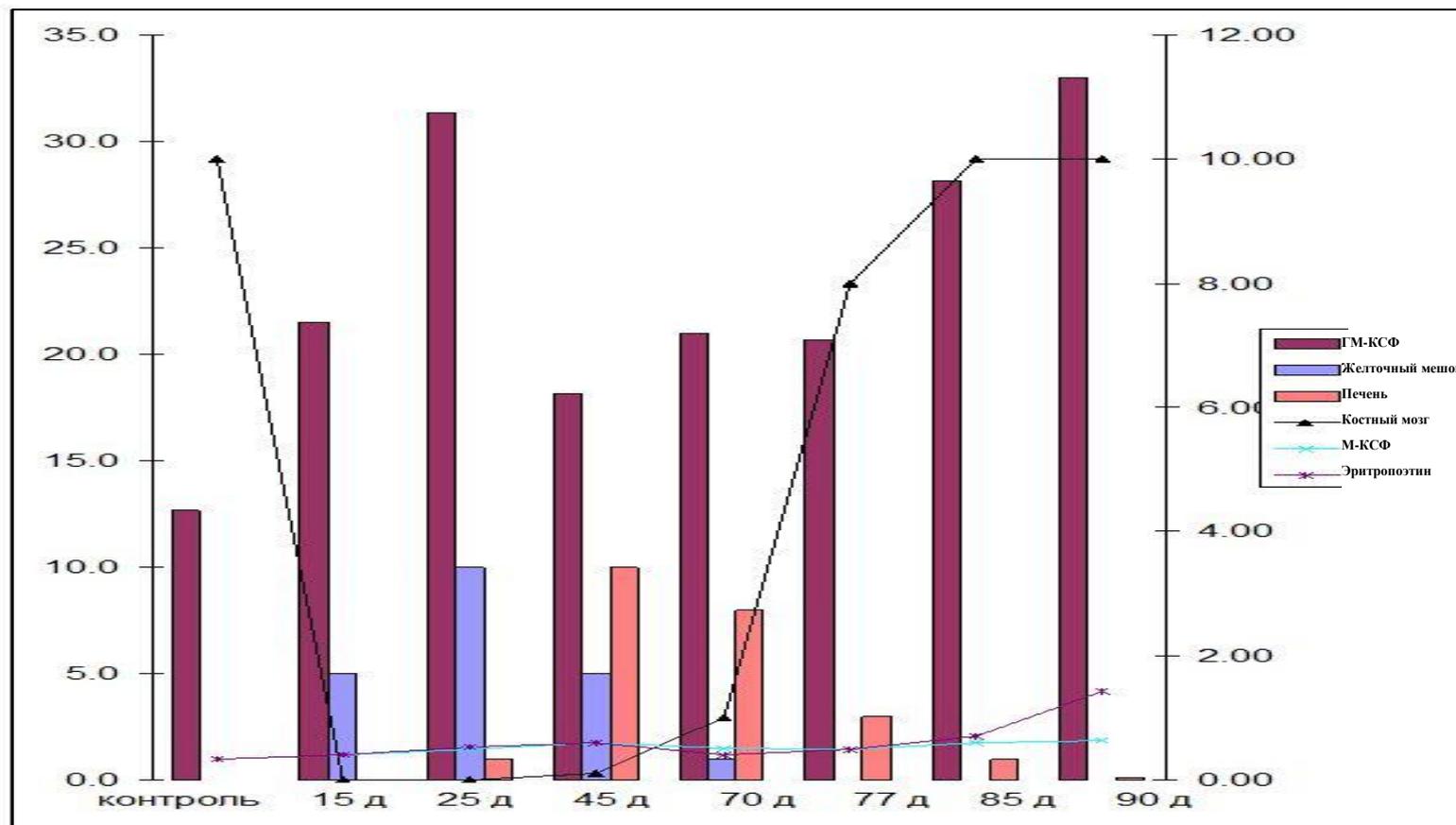
(происхождение – желточный мешок) и нормобласты (происхождение – печень) [Tatoyan M. et al, 2016]. Появление безъядерных эмбриональных эритроцитов, в современной литературе [Chasis J.A., Mohandas N., 2008] часто связывается с началом формирования и функционирования печеночных эритробластических островков и, следовательно, формированием макрофагов эритробластических островков.

Как следует из графика 23, первый подъем сывороточного уровня материнского ГМ-КСФ предшествует возникновению печеночного эритропоэза. Это объясняется возникновением эритробластических островков, центральным элементом которых является макрофаг. Соответственно это совпадает с возникновением значимой, по общему вкладу в эритропоэз, популяции безъядерных эритроцитов. Следующий - второй подъем сывороточного уровня материнского ГМ-КСФ предшествует переходу эритропоэза в костный мозг, и интенсификацией эритропоэза, связанного как с увеличением размером плода, так и с дифференцировкой клеток эритроидного ряда. Подъем сывороточного уровня материнского эритропоэтина приходится на заключительный этап пренатального развития свиньи, и тем самым не может быть связан с основными процессами развития эритропоэза у свиньи.

Таким образом, роль макрофагов в появлении безъядерных эритроцитов становится важной после 25 суток развития эмбриона свиньи, именно на этот срок приходится первый пик подъема уровня гранулоцит-макрофаг колониестимулирующего фактора (и в некоторой степени и макрофаг колониестимулирующего фактора, где лишь из-за больших разбросов увеличение уровня остается недостоверным). Следовательно, необходимо уделить внимание вовлеченности макрофагальных колониестимулирующих факторов в эмбриональном эритропоэзе млекопитающих.

График 23

Сравнение периодизации эмбрионального эритропоэза у свиней с уровнем колониестимулирующих факторов в крови беременных свиноматок.



Схематическое изображение периодов эритропоэза в желточном мешке, печени и GM-CSF - гистограммы. Уровни M-CSF, эритропоэтина, костного мозга в крови у беременных свиноматок – линейные схемы.

По оси ординат дни гестации, по правой оси абсцисс - M-CSF, эритропоэтин, по левой оси абсцисс - GM-CSF, желточный мешок, печень, костный мозг.

Необходимо добавить, что у млекопитающих показана также вовлеченность КСФ (в частности ГМ-КСФ) в процессы эритропоэза у зрелых мышей [Jegalian A.G. et al., 2002]. Более ранняя работа выявила стимулирующее действие ксеногенного гранулоцит-макрофаг колониестимулирующего фактора не только на миелопоэз, но и на эритропоэз у мышей [Nishijima I. et al, 1997]. При этом, в условиях и *in vitro* и *in vivo*, рядом авторов отмечается угнетающее действие ГМ-КСФ на дифференцировку эритроидных клеток [Hermine O. et al., 1996; Udupa K.V., Sharma V.G., 1996).

Таким образом, можно заключить, что стимулирующее действие гранулоцит-макрофаг колониестимулирующего фактора связано не с дифференцировкой эритроидных клеток, а с активацией и дифференцировкой макрофагов, в том числе и центральных макрофагов эритробластических островков. В пользу нашего предположения говорят и данные о том, что гранулоцит-макрофаг колониестимулирующий фактор также, имеет выраженное стимулирующее действие на эритроидные колониобразующие единицы эритропоэза [Aglietta M. et al., 1993]. Было показано стимулирующее влияние ГМ-КСФ на эритропоэз у больных с патологией костного мозга [Vadhan-Raj S. et al, 1988].

Гранулоцит-макрофаг колониестимулирующий фактор способен проникать через плацентарный барьер у человека [Gregor H. et al, 1999]. Проникновение материнского ГМ-КСФ, происходило в небольших количествах (около 2,5% фактора проходило к эмбриону от общего, исходного уровня в материнской циркуляции). Это объясняет возможное влияние материнских факторов на активацию макрофагов эмбриона и один из возможных механизмов энуклеации эритроидных клеток, на стадии примитивных эритроидных клеток.

В отношении изменений уровней макрофаг колониестимулирующего фактора, была показана их зависимость (по крайней мере, частичная) от уровня половых гормонов, секретируемых в желтом теле яичников и плаценте [Azuma C. et al., 1991; 1990]. Тем самым выявляется возможный механизм регуляции материнскими гормонами и колониестимулирующими факторами эритропоэза эмбриона.

При корреляционном анализе колониестимулирующих факторов, эритропоэтина и периодов эритропоэза в онтогенезе свиньи выявлено, что они положительно коррелируют с развитием эритропоэза в костном мозге, а также друг с другом (табл. 23). Данные корреляционного анализа позволяют связать возрастание уровней этих колониестимулирующих факторов с развитием эритробластических островков в костном мозге. Таким образом, нами показана возможная роль материнских сывороточных факторов в физиологии эритропоэза свиней.

Таблица 23.

Корреляционный анализ КСФ с параметрами эмбрионального эритропоэза

Параметры	Желточный мешок	Печень	Селезенка	Костный мозг	ГМ-КСФ	М-КСФ	Эритропоэтин
Желточный мешок	1	-0.40	-0.30	-0.39	0.11	-0.43	-0.26
Печень	-0.40	1	0.69**	-0.26	-0.01	0.45	-0.17
Селезенка	-0.30	0.69**	1	-0.32	-0.30	0.34	-0.21
Костный мозг	-0.39	-0.26	-0.32	1	0.58**	0.62**	0.81*
ГМ-КСФ	0.11	-0.01	-0.30	0.58**	1	0.62**	0.69*
М-КСФ	-0.43	0.45	0.34	0.62**	0.62**	1	0.68*
Эритропоэтин	-0.26	-0.17	-0.21	0.81*	0.69*	0.68*	1

Примечание: представлены коэффициенты корреляции и уровни их достоверности

корреляция проводилась по Пирсону с оценкой коэффициента (r)

достоверность определялась по непараметрическому u-критерию Вилкоксона-Манна-Уитни

* корреляция, ** тенденция

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обобщая все выше изложенное, можно прийти к заключению, что нами впервые удалось наиболее полно выявить временные рамки и физиологические особенности основных онтогенетических этапов развития эритропоза свиней. Оказалось, что несмотря на общность развития эритропоза с другими млекопитающими, у свиней он имеет ряд особенностей.

Долгое время считалось, что образование первичных эритробластов происходит внутри сосудов желточного мешка, стенка которого является первым кроветворным органом у всех животных, имеющих желточный мешок (Mervin C. et al., 1999; Ghatpane S. et al., 2002]. В последнем содержатся полипотентные стволовые клетки, дающие начало всем росткам кроветворения [Tada T. et al., 2006; Isern J. et al., 2008; Sheng G., 2010].

В настоящее время стало известно, что у многих млекопитающих через некоторое время после оплодотворения почти одновременно с кроветворением в желточном мешке, возникает интраэмбриональное кроветворение. Источником образования клеток крови при этом становится зародышевая мезенхима и на первом этапе эмбриогенеза отмечается односторонняя направленность дифференцировки стволовых клеток в сторону эритропоза [Baron M. et al., 2012; Baron M. et al., 2013; Mikkola H.K., Orkin S.H., 2006; Kritzenberger M., Wrobel K.H., 2010].

Проведенное нами исследование показало, что в эмбриогенезе свиньи формируется интраэмбриональная зона локализации гемопоэтических клеток, которая включает парааортальную мезенхиму и аорто-гонадо-мезонефральную область. Очаги кроветворения предположительно обнаруживаются с 13-15 суток гестации, затем постепенно уменьшаясь к 25 суткам, практически исчезают к 35 суткам. Исследуя функциональную активность гемопоэтических клеток, нами впервые показано, что в мезенхимальном эритропозе у свиней морфологически, морфометрически и цитофотометрически различаются две линии клеток – крупные примитивные эритроидные клетки и сравнительно мелкие в эритробластной линии (появляются позже - с 25суток). Пролиферативная активность

гемопоэтических клеток мезенхимального эритропоэза также снижается к 25 суткам и практически исчезает к 35 суткам гестации. Эти данные совпадают с результатами исследования распределения ядер мезенхимальных клеток по классам ploидности. Оказалось, что уже на 15 сутки развития эмбриона популяция эритроидных клеток активно пролиферирует и более 20% клеток находится на различных стадиях митотического цикла (S и G₂). К 25 суткам развития эмбриона популяция пролиферирующих клеток снижается более чем в два раза, а к 35 суткам делящихся клеток практически нет, что подтверждает выявленные нами данные о сроках завершения мезенхимального эритропоэза у свиней.

Уточнение сроков мезенхимального эритропоэза имеет практическое значение, так как позволяет успешно проводить трансплантацию мезенхимальных стволовых клеток, как аутологичных, так и аллогенных. Данный метод в последние годы широко используется в клинической практике для ускорения приживления кроветворных предшественников и для профилактики и терапии реакции трансплантат-против-хозяина [Владимирская Е.Б., 2007].

В дальнейшем с 15-25 суток гестации эритропоэз несет смешанный характер, когда клетки крови образуются за пределами зародыша в стенки желточного мешка, а также и в мезенхиме где формируются очаги кроветворения - кровяные островки. Центральные клетки островков округляются, обособляются и преобразуются в стволовые кроветворные клетки, а периферические клетки островков растягиваются в плоские, связанные между собой клетки и образуют эндотелиальную выстилку первичных кровеносных сосудов. В результате соединения разрозненных вначале островков образуется сосудистая сеть желточного мешка. Часть стволовых клеток превращается в крупные базофильные клетки, так называемые первичные кровяные клетки. Интенсивно размножаясь эритроидные клетки желточного мешка активно пролиферируют не только в кровяном островке, но и в просвете сосуда и большая часть их постепенно утрачивает базофилию и все сильнее окрашивается кислыми красителями. Это происходит в связи с синтезом и накоплением в цитоплазме гемоглобина. Полученные нами данные по содержанию гемоглобина в эритроидных клетках желточного мешка, свидетельствует о недостоверности различий в содержании гемоглобина в примитивных эритроидных клетках и в примитивных эритроцитах 15 и 25 дневных

зародышей свиньи. Однако эти клетки содержат значительно больше гемоглобина ($p < 0.01$), по сравнению с недифференцированными предшественниками гемопоэтических клеток желточного мешка. Нами не выявлена разница в содержании гемоглобина в ди- и тетраплоидных клетках у 15 дневного эмбриона свиньи. Разница в содержании общего белка в недифференцированных предшественниках гемопоэтических клеток желточного мешка, у примитивных эритроидных клеток и у примитивных эритроцитов также недостоверна.

По мере углубления процессов дифференцировки в эритроидных клетках желточного мешка свиньи происходит снижение содержания РНК. В недифференцированных предшественниках гемопоэтических клеток желточного мешка содержится больше РНК, чем в примитивных эритроидных клетках и в примитивных эритроцитах и на 15 и на 25 сутки развития зародыша ($p < 0.05$). В предшественниках гемопоэтических клеток содержание общего белка, в целом, не меньше чем у зрелых эритроидных клеток желточного мешка. Однако концентрация гемоглобина в ранних клетках значительно меньше (более, чем 3.5-4 раза). Возможно, это объясняется недостаточной дифференцировкой данных клеток. С углублением процессов дифференцировки начинается ускоренный синтез гемоглобина, который становится основным белком как у примитивных эритроидных клеток, так и у примитивных эритроцитов. Одновременно в ядре увеличивается количество конденсированного хроматина.

Впервые нами показано, что в мегалобластическом эритропоэзе свиней в части клеток возможна экструзия ядер и формирование безъядерных примитивных эритроцитов. По нашим данным у свиней они составляют не более 2-2,5% эритроидных клеток. Данный тип клеток определяется на 15-25 сутки развития эмбриона свиньи и почти полностью исчезает к 35 суткам гестации. Образующаяся генерация ядерных и безъядерных первичных эритроцитов разнообразна по размерам, однако чаще всего встречаются крупные клетки - мегалобласты и мегалоциты.

Мегалобластический тип кроветворения характерен для эмбрионального периода. Часть первичных кровяных клеток в эмбриональных сосудах проходит более длительный путь развития и образует популяцию вторичных эритроцитов, имеющих меньшие размеры и

по внешнему виду мало отличающихся от эритроцитов взрослых животных - нормобластический вариант кроветворения.

Сравнительный анализ временной локализации кроветворных тканей во время внутриутробного развития свиньи выявил, что в отличие от человека (по данным литературы и у крыс), у свиньи происходит более раннее участие печени в эритропоэзе, уже начиная с 25-го дня гестации.

Нами показано, что печень эмбрионов свиней закладывается на 15 сутки, а кроветворение в ней начинает развиваться с 25 дня. Источником кроветворения в печени являются стволовые кроветворные клетки, которые мигрируя из желточного мешка, врастают вместе с мезенхимой внутрь печеночных долек. Максимум активности процессов кроветворения в печени приходится на 45 и 65 дни гестации, после чего гемопоэз в ней постепенно затухает, заменяясь костномозговым кроветворением, которое в этом периоде преимущественно миелоидное.

Оказалось, что уже на 25-сутки внутриутробного развития эмбриона свиньи, в печени хорошо заметны экстравакулярные (по ходу капилляров) очаги кроветворения, а на пике печеночного кроветворения эритропоэтическая ткань достигает 40% объема печени. Затем, в промежутке времени от 45 дней эмбриогенеза до 65 дней наблюдаются недостоверные колебания в объеме эритропоэтической ткани, а затем ее объем плавно, но недостоверно уменьшается. Уже у новорожденного поросенка объем кроветворной ткани в печени не превышает 5-7% от общей ткани печени, а в месячном возрасте печеночное кроветворение полностью заменяется костномозговым кроветворением [Арзуманян Г.А. и соавтр., 2015].

В виду того, что отдельные очаги примитивного эритропоэза у свиней сохраняются вплоть до 35-45 суток гестации, на ранних сроках развития эритропоэза (25-35 сутки гестации) у эмбрионов свиней в кровеносной системе одновременно циркулируют две разные системы эритропоэтических клеток, а именно примитивный мегалобластический и нормобластический типы эритропоэза. Оказалось, что у свиней эритропоэз в желточном мешке продолжается достаточно долго после возникновения кроветворения в печени и

образования характерных для данного этапа эритроидных клеток и сохраняется даже при полностью завершеном печеночном этапе эритропоэза. Важным отличием эритропоэза свиней от других млекопитающих является более важная роль печени в данном процессе. Оказалось, что отдельные очаги эритропоэза печени сохраняются и после рождения, а в пренатальный период, вплоть до 70-80 дней гестации, печень является ведущим органом эритропоэза.

Таким образом на начальном этапе печеночного гемопоэза происходит формирование примитивных эритроидных клеток, аналогичных таковым в желточном мешке. Эти гемангиобласты вскоре формируют очаги гемопоэза, аналогичные кровяным островкам желточного мешка и мезенхимы, в которых уже на ранних стадиях заметны клетки, значительно меньшего размера, чем примитивные эритроидные клетки. Эти клетки обнаруживаются в сосудах эмбриона уже в возрасте 25 дней, однако в значимом количестве они появляются в циркуляции гораздо позднее. Наличие двух типов эритроидных клеток свидетельствует не только о возникновении новой собственно печеночной генерации эритроидных клеток, но и их способностью к созреванию в структуре эритробластического, а не кровяного островка.

Согласно современным представлениям, макрофагам отводится значительная роль в регуляции функциональной активности гемопоэтических клеток и именно макрофагами эритробластического островка (ЭО) создается специфическое микроокружение, которое обеспечивает пролиферацию и дифференцировку эритроидных клеток. Возникновение эритробластических островков у свиней, следует отнести к 35-45 дню эмбриогенеза, когда образуется значимая популяция безъядерных эритроцитов. А начиная с 45 дня эмбриогенеза в печени обнаруживаются эритробластические островки с центральным макрофагом, а также выявлена характерная для эритробластических островков экструзия ядра эритробласта с ее последующим фагоцитозом центральным макрофагом островка. Таким образом, в печени последовательно сменяются два типа эритропоэза – примитивный и дефинитивный.

При сравнении печеночных и костномозговых макрофагов эритробластических островков оказалось, что эритробластические островки, расположенные в костном мозге,

превосходят более чем в два раза по площади печеночные эритробластические островки. При этом в окружении центрального макрофага эритробластического островка в костном мозге находятся в два раза больше ядросодержащих эритроидных клеток, по сравнению с печеночными эритробластическими островками. Содержание белка в исследуемых эритробластических островках не имели достоверных отличий.

При сопоставлении содержания ДНК в ядрах печеночных и костномозговых макрофагов оказалось, что для дифференцировки определенной части макрофагов в печеночном эритробластическом островке выявляется синтез ДНК, приводящий к увеличению содержания ДНК в ядре. Данные процессы особенно выражены на 55-65 дни гестации. С учетом данных по вовлечению ткани печени в эритропоэз, можно полагать, что увеличение содержания ДНК в ядрах макрофагов эритробластических островков печени связано с возрастанием участия печени в общем эритропоэзе, а снижение содержания ДНК в ядрах макрофагов на более поздних стадиях эритропоэза совпадает с угасанием печеночного эритропоэза.

Нами также выявлено, что для созревания центральных макрофагов эритробластических островков костного мозга свиней характерно возрастание содержания ДНК в ядрах, вплоть до формирования полиплоидной популяции, а после рождения в костном мозге свиней имеется тетраплоидная, гипертетраплоидная и даже октаплоидная популяции макрофагов эритробластических островков. Полиплоидизация макрофагов, вероятно, связана с активацией процессов эритропоэза, когда увеличение размеров ядра связано с увеличением размеров клетки в целом [Tatoyan M. et al., 2016]. Последнее приводит к ускоренному фагоцитозу, а в эритробластических островках, соответственно к ускорению экструзии ядер и созреванию эритробластов, окружающих макрофаг. Следовательно, мы можем полагать, что полиплоидия макрофагов эритробластических островков, связана с функциональным ускорением эритропоэза.

Наиболее важным этапом является эритропоэз в костном мозге. Образование красного костного мозга у свиней начинается в ранний период эмбриогенеза, во время образования хрящевого скелета. Уже на 25 сутки внутриутробного развития эмбриона

свиньи в хрящевом скелете появляется полость, в которой активно пролиферируют стромальные клетки (остеобласты, ретикулярные клетки). Паренхима костного мозга возникает значительно позже. Очаги гемопоэза в костном мозге эмбриона свиньи начинают формироваться лишь на 45 ± 5 сутки внутриутробного развития эмбриона свиньи, а эмбриональный костный мозг заметно отличается от центров более раннего развития гемопоэза тем, что образование миелоидных клеток (в отличие от эритроидных) идет здесь особенно энергично и преобладает в гемопоэзе уже на ранних этапах.

Таким образом, нами показана последовательность замены примитивного эритропоэза в желточном мешке на эритропоэз в эритробластических островках. Эта замена происходит у 25 дневного эмбриона и практически заканчивается у 35 дневного, и сопровождается полным исчезновением клеточной популяции желточного мешка. Наши исследования выявили безъядерные примитивные эритроидные клетки на 25-35 сутки внутриутробного развития эмбриона свиньи. Их размеры, значительно превышают размеры не только зрелых эритроцитов костномозгового происхождения, но и эритроцитов, образующихся в ранних эмбриональных эритробластических островках с центральным макрофагом.

Основным функциональным показателем эритроидных клеток является содержание гемоглобина. Оказалось, что ранние, более примитивные клетки содержат больше гемоглобина, по сравнению с более поздними, однако, необходимо заметить, что их размеры также значительно превышают таковые зрелых клеток. Вследствие этого эффективность переноса кислорода, а тем более газообмена вследствие большей суммарной поверхности несомненно, намного выше у зрелых клеток.

Нами проведено также исследование механизмов регуляции эритропоэза в процессе онтогенеза и показано участие материнских колониестимулирующих факторов в пренатальном эритропоэзе свиней. Оказалось, что стимулирующее действие гранулоцит-макрофаг колониестимулирующего фактора по временной шкале совпадает не с дифференцировкой эритроидных клеток, а с активацией и дифференцировкой макрофагов, в том числе и центральных макрофагов эритробластических островков печени [Tatoyan M. et

al., 2016]. При этом сывороточные уровни материнского эритропоэтина не играют существенной роли в регуляции эритропоэза.

Таким образом, нам удалось уточнить, а в некоторых случаях и выявить временные рамки и локализацию основных этапов эритропоэза в онтогенезе свиньи. Нами показаны новые аспекты созревания клеток примитивного эритропоэза. Впервые исследованы эритробластические островки печени и механизмы регуляции пренатального эритропоэза свиньи.

ВЫВОДЫ

1. Выявлено, что весь период мезенхимального эритропоэза у свиней занимает около трех недель - он появляется на 15, а у некоторых зародышей на 13 сутки внутриутробного развития эмбриона. На 25 сутки пролиферативная активность гемопоэтических клеток начинает снижаться и практически исчезает на 35 сутки внутриутробного развития зародыша свиньи.
2. Выявлены более ранние сроки развития эритропоэза в желточном мешке зародыша свиньи по сравнению с данными литературы.
3. Основная часть примитивных эритроидных клеток 15 дневного эмбриона в желточном мешке представлена активно пролиферирующими клетками, на 25-е сутки происходит частичное угасание пролиферативной активности и полное исчезновение клеточной популяции желточного мешка после 35 суток развития эмбриона.
4. Выявлено совместное функционирование двух центров кроветворения на 25 сутки внутриутробного развития эмбриона (в желточном мешке и в печени).
5. В мегалобластическом эритропоэзе свиней на 15-25 сутки развития эмбриона, обнаружены безъядерные примитивные эритроциты, которые почти полностью исчезают к 35 суткам.
6. Зрелые безъядерные эритроциты (меньшего размера по сравнению с примитивными эритроцитами) в незначительных количествах, обнаруживаются в сосудах эмбриона уже на 25 сутки внутриутробного развития эмбриона.
7. Эритропоэз в селезенке, возникает на 45-55 суткам развития эмбриона, достигает максимума к 65 суткам. Объем эритропоэза в селезенке значительно уступает таковому в печени, из-за больших размеров печени и ее большей вовлеченности в кроветворные процессы.
8. Эритропоэз в костном мозге свиней возникает у 45 дневного эмбриона и до конца гестации в нем преобладают процессы миелопоэза.
9. Выявлено, что площадь центральных макрофагов эритробластических островков расположенных в костном мозге превосходят более чем в два раза площадь макрофагов эритробластических островков печени. При этом, в окружении центрального макрофага

эритробластического островка в костном мозге находятся в два раза больше ядродержащих эритроидных клеток.

10. Показано вовлечение в пренатальный эритропоэз материнских колониестимулирующих факторов, стимулирующее действие которых связано с активацией и дифференцировкой макрофагов (в том числе и центральных макрофагов эритробластических островков) и не связано с дифференцировкой эритроидных клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абдрахманов И.К. Стволовые клетки животных. // Клеточная биотехнология, цитология, генетика. Ветеринарная патология. 2005, № 1, стр. 55-58.
2. Абдулкадыров К.М., Балашова В.А. Клеточный состав печени и селезенки в фетальном периоде. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2008, Том III, № 1, стр. 46-48.
3. Алакаева И.Б., Непокульчицкая Н.В., Самсыгина Г.А., Высоцкая Т.А. Особенности гемопоэза во внутриутробном периоде и влияние на него врожденных инфекций // Педиатрия. 2009, Том 87, №4, стр. 122-125.
4. Александров В.Н., Сергеев В.С. Влияние тяжелой политравмы на миграцию стволовых кроветворных клеток у мышей. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2006, 2(4), стр. 59-62.
5. Андреева С.Д. Характеристика лимфоидных структур селезенки свиней. // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2013, №4, стр. 97-98.
6. Антипов А.А., Жаров А.В. Гистологические и морфометрические изменения печени, почек, селезенки и лимфатических узлов у поросят при алиментарной железодефицитной анемии // Российский ветеринарный журнал. Мелкие домашние и дикие животные. 2013, № 1, стр. 19-21.
7. Арзуманян Г.А., Татоян М.Р, Сароян Д.А. Эмбриональное кроветворение в печени свиньи // Кровь. Научно-практический журнал. 2015,1(19), стр. 50-53.
8. Барановская И.Б., Онищук С.А. Гемоглобин ретикулоцитов в дифференциальной диагностике анемий. // ВЕСТНИК ОГУ. 2008, №81 стр. 129-134.
9. Башина С.И., Зайцева Е.В. К возрастной морфология селезенки свиньи в постнатальный онтогенез. // Вестник Брянского государственного университета, 2012, № 4(2), стр. 111-113

10. Билько Н.М., Брумбаров К., Кросс М., Вобус А. Тотипотентная стволовая клетка и гемопоэз // Ветеринарная патология. 2003, № 1, стр. 22-24.
11. Блиндарь В.Н., Зубрихина Г.Н. Диагностическая значимость определения уровня эритропоэтина в клинической практике (обзор литературы). // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 2007, т. 18, №1, стр.10-16.
12. Бозо И.Я. Облучение определяет отрицательный эффект применения гранулоцитарного клоноини стимулирующего фактора после аллогенной трансплантации костного мозга // Новости клеточных технологий. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия, 2009, Том IV, № 3, стр. 18-19.
13. Бондарь Т.П., Верещак Е.В., Галимова О.И., Половко Ю.И. Алгоритм исследования адаптационных возможностей эритрона. // ВЕСНИК МДПУ імя І. П. ШАМЯКІНА, 2007, № 2 (17), стр. 30-36.
14. Боровская М.К., Кузнецова Э.Э., Горохова В.Г., Корякина Л.Б., Курильская Т.Е., Пивоваров Ю.И. Структурно-функциональная характеристика мембраны эритроцита и ее изменения при патологиях разного генеза // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН, 2010, № 3 (73), стр. 334-354.
15. Владимирская Е.Б. Мезенхимальные стволовые клетки в клеточной терапии // Онкогематология, 2007, № 1, стр. 4-16.
16. Владимирская Е.Б. Нормальное кроветворение и его регуляция // Нормальное кроветворение и его регуляция, 2015, стр. 109-119.
17. Волкова И.М., Викторова Е.В., Савченкова И.П., Гулюкин М.И. Характеристика мезенхимных стволовых клеток, выделенных из костного мозга и жировой ткани крупного рогатого скота. // Сельскохозяйственная биология, 2012, № 2, стр. 32-38.
18. Волкова Н.А., Шихов И.Я., Зиновьева Н.А., Волкова Л.А., Эрнст Л.К., Томгорова Е., Брем Г. Фенотипические особенности свиней в период эмбриогенеза при интеграции гена рилизинг-фактора гормона роста человека. // Сельскохозяйственная биология, 2007, № 2, стр. 37-41.

19. Волчков П.Ю., Лагарькова М.А., Прохорович М.А., Киселев С.Л. Двойной негативный эпигенетический контроль генов, вовлеченных в регуляцию дифференцировки ЭСК человека в эндотелий. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия, 2007, Том II, №2, стр.34-39.
20. Воробьев Д.И. Руководство по гематологии в 3-х томах. // Под ред. Воробьева Д.И. 2002, перераб. и допол.. М., Ньюдиамед, 280с.
21. Галеева Э.Н. Характерные особенности становлений топографии ряда органов иммунной системы человека в раннем плодном периоде онтогенеза // Вестник новых медицинских технологий. 2011, Том XVIII, № 2, стр. 489 – 492.
22. Гелашвили О.А. Вариант периодизации биологически сходных стадий онтогенеза человека и крысы. // Саратовский научно-медицинский журнал, 2008, №4(22), стр.125-126
23. Герасимов В.И., Пронь Е.В., Хохлов А.М., Данилова Т.Н. Воспроизводство свиней и выращивание молодняка на малых фермах // Вестник Курской сельскохозяйственной академии, 2014, №1, стр. 43-47.
24. Гизатуллин А.Н. Характеристика гематологических и иммунологических показателей свиней с различной стресс-устойчивостью // Аграрный вестник Урала Аграрный вестник Урала, 2008, №9 (51), стр. 76-78.
25. Гизатуллина Ф.Г. Иммунный статус свиноматок с различной стресс-устойчивостью // Известия ОГАУ, 2005, №8-1, стр. 88-90.
26. Гимадеева Л.С., Гусев И.В., Рыжков В.А., Рыков Р.А. Сравнительная оценка гематологических показателей свиней разных технологических групп // Известия ОГАУ, 2015, №5 (55), стр. 148-151.
27. Гольдберг Е.Д. Дыгай А.М., Жданов В.В. Динамическая теория регуляции кроветворения и роль цитокинов в регуляции гемопоэза // Медицинская иммунология, 2001, Том 3, №4, стр. 487-497.

28. Гривенников И.А. Эмбриональные стволовые клетки и проблема направленной дифференцировки // Эмбриональные стволовые клетки Успехи биологической химии, т. 48, 2008, стр. 181–220.
29. Григорьев Е.В., Плотников Г.П., Шукевич Д.Л., Головкин А.С. Биологическая искусственная печень // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний, 2014, № 4, стр. 70-79.
30. Григорян А.С., Кругляков П.В. Молекулярный контроль плюрипотентности // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия, 2008, Том III, №2, стр. 38-44.
31. Грицаев С.В., Павлова И.Е., Семенова Н.Ю. Отдельные аспекты трансплантации гемопоэтических стволовых клеток онкогематологическим больным (лекция) // Вестник гематологии, 2015, Том XI, № 3, стр. 9-28.
32. Двирнык В.Н., Кузьмина Л.А., Кохно А.В., Гласко Е.Н., Гемджян Э.Г., Паровичникова Е.Н. Морфологические особенности кроветворения после трансплантации аллогенного костного мозга при миелодиспластических синдромах // Гематология и трансфузиология, 2014, Том 59, № 1, стр. 4-10.
33. Долгов В.В., Луговская С.А., Морозова В.Т., Почтарь М.Е. Морфология и кинетика клеток эритропоэза // Лабораторная диагностика анемий: Пособие для врачей. Тверь, «Губернская медицина», 2001, http://bono-esse.ru/blizzard/Lab/Anemia/morfologia_kinetika_eritropoeza.html
34. Домарацкая Е.И. Экспериментальное исследование клеточных механизмов кроветворения в онтогенезе // Тема доктр.диссертации и автореферата по ВАК 03.00.25, 2004, стр. 242. disserCat <http://www.dissercat.com/content/eksperimentalnoe-issledovanie-kletochnykh-mekhanizmov-krovetvoreniya-v-ontogeneze#ixzz4Elkfg0Bo>
35. Дорофиенко Н.Н. Формирование пупочного канатика на разных стадиях гестации // Бюллетень физиологии и патологического дыхания, 2011, № 41, стр.38-41
36. Дыгай А.М, Жданов В.В Теория регуляции кроветворения в норме и при патологии // Бюллетень СО РАМН, 2012, Том 32, № 1, стр. 21-30.

37. Жуков А.П., Аглюнина А.Р., Ростова Н.Ю. Морфология крови крупного рогатого скота в различных экологических условиях // Вестник Алтайского государственного аграрного университета, 2016, № 6(26), стр. 42-45.
38. Журавель Н.А., Журавель В.В. Показатели обмена веществ в организме поросят на фоне действия стресс-факторов // Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана, 2011, № 206, стр. 63-67.
39. Зайцева Е.В., Башина С.И., К возрастной морфологии селезенки свиньи в постнатальном онтогенезе // Дальневосточный аграрный вестник, 2012, №4(24), стр. 20-22.
40. Запускалов И.В., Кривошеина О.И., Хлусов И.А., Мартусевич Я.А., Морфофункциональные свойства стромальных стволовых клеток при культивировании *in vitro* в динамических условиях // Бюллетень сибирской медицины, 2009, № 4, стр. 28-33.
41. Захаров Ю.М., Камиллов Ф.Х. влияние острой кровопотери на содержание свободных аминокислот в ткани костного мозга, почек и печени у кроликов // Медицинский вестник Башкортостана. 2014, Том 9, № 1, стр. 77-80.
42. Захаров Ю.М., Мельников И.Ю., Тишевская Н.В., Шевяков С.А. Исследование роли межклеточных взаимодействий в регуляции эритропоэза в эритробластических островках костного мозга // Сборник научных работ. Екатеринбург: Изд-во Вестник уральской медицинской академической науки, 2015, стр.11-15.
43. Зиновьева Н.А., Мелерзанов А.В., Петерсен Е.В., Климяк Н., и др. Использование трансгенных gal-ko свиней в ксенотрансплантации: проблемы и перспективы // Сельскохозяйственная Биология, 2014, №2, стр. 42-49.
44. Иванюк Д.И., Турчин В.В., Попандопуло А.Г., Гринь В.К. Механизмы иммуномодулирующего действия мезенхимных стволовых клеток // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия, Том VI, № 2, 2011, стр. 27-31.

45. Калинина Н.И., Сысоева В.Ю., Рубина К.А., Парфенова Е.В., Ткачук В.А. Мезенхимальные стволовые клетки в процессах роста и репарации тканей // *Acta Nature*, 2011, Том 3, № 4 (11), стр. 32-39.
46. Калязина Н.Ю., Зенкин А.С. Коррекция миелопоеза у животных при квантовом воздействии на биологически активные точки // *Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана*, 2013, <http://cyberleninka.ru/article/n/korreksiya-mielopoeza-u-zhivotnyh-pri-kvantovom-vozdeystvii-na-biologicheski-aktivnye-tochki#ixzz4XA0pxY23>
47. Капанадзе Г.Д. Использование миниатюрных свиней в биомедицинских экспериментах // *Биомедицина*, 2006. №2, стр.40-51.
48. Капанадзе Г.Д., Ашуев Ж.А. Светлогорская популяция мини-свиней // *БИОМЕДИЦИНА*, 2007, № 6, стр. 70–80.
49. Капанадзе Г.Д. Биологические и зоотехнические особенности светлогорских мини-свиней, их совершенствование и рациональное использование // Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук, 2011, 46с.
50. Каралова Е.М., Татоян М. Р., Аброян Л.О., Акопян Л.А., Аветисян А.С., Каралян З.А. Пролиферация и дифференцировка эритроидных клеток на разных стадиях первичного эритропоэза крыс. // *Вопросы теоретической и клинической медицины*, 2017, Том 20, № 3 (113), стр. 9-13
51. Каралова Е.М. Молекулярно-клеточные механизмы восстановления эритрона при гемолитической анемии у теплокровных // моногр. Ереван, Институт молекулярной биологии НАН РА, 2012, 164с.
52. Каралова Е.М., Корвин-Павловская Е.Г., Кульминская А.С., Магакян Ю.А., Газарян К.Г. Пути дифференцировки первичных эритроидных клеток у кур. // *Цитология*, 1985, Том 27, №6, стр.656-662
53. Каркищенко Н.Н. Через критерии подобия и аллометрии к валидации и экстраполяции в биомедицине // *БИОМЕДИЦИНА*, 2007, № 6, стр. 5–24.
54. Климович В.Б. Иммуномодулирующая активность мезенхимальных стромальных (стволовых) клеток // *Медицинская иммунология* 2014, Том 16, № 2, стр. 107-126.

55. Козлов В.А. Способностью к трансдифференцировке обладают эритроидные предшественники! Почему нет? // Сибирский онкологический журнал, 2005. №1 (13), стр.11-15
56. Кокорев О.В., Чердынцева Н.В., Зайцева К.В., Волгушаев С.В. Теоретические и практические аспекты трансплантации стволовых клеток в онкологии // Сибирский онкологический журнал, 2005, №4 (16), стр. 53-61.
57. Корвин-Павловская Е.Г., Каралова Е.М., Кульминская А.С., Магакян Ю.А., Газарян К.Г. Внецикловый синтез ДНК, накопление общего белка и гемоглобина в клетках эритроидного ряда при анемии у голубей // Цитология, 1978, Том XX, № 9, стр. 1016-1026
58. Крестьянинова О.Г. О характере эритропоэза в эритробластических островках костного мозга при экспериментальных анемиях. // Дис.канд. биол. наук Челябинск, 1994, 123 с.
59. Кривенцев Ю.А., Бисалиева Р.А., Носков А.И. Гемоглобины человека // ВЕСТНИК АГТУ, 2007, № 6 (41), стр. 34-41.
60. Кругляков П.В., Лохматова Е.А., Климович В.Б., А.Ю. Зарицкий Мезенхимные стволовые клетки и иммунопатологические состояния организма // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия, 2006, № 3 (5), 2006, стр. 36-41
61. Куприкова И.М., Степанова И.П., Новикова Т.Г., Боженкова М.В. Эмбриональный гемопоэз // Образовательные модули, Журнал анатомии и гистопатологии, 2012, Том 1, № 197, стр. 93-99.
62. Куртова А.В., Зуева Е.Е. Количественный учет CD34+ гемопоэтических стволовых клеток в цельной пуповинной крови // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия, 2006, № 1(3), стр. 66-71.
63. Куртова А.В., Эстрина М.А., Алексеев С.М., Трофимова С.А., Тупицына О.А., Карпов В.Г., Здоров А.Е. и др. Экспрессия CXCR4 и эффективность мобилизации CD34+ гемопоэтических стволовых клеток. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия, 2007, Том II, № 3 стр. 51-56.

64. Кухаренко Н.С., Кухаренко А.А., Ковальчук И.В. Анемия – причина сокращения поголовья дикого кабана в амурской области // Вестник КрасГАУ, 2011. №10, стр. 177-180.
65. Лазебник Л.Б., Голованова Е.В., Слупская В. А., Князев О. В., Гендриксон Л. Н., Хомерики С.Г., Гудкова Р.Б. Мезенхимальные стволовые клетки в лечении хронических заболеваний печени от эксперимента к клинической практике // Терапевтическая гастроэнтерология, 2012, № 6, стр. 13-21
66. Латюшин Я.В., Шелгаев Н.Ю., Павлова В.И., Шахов В.П. Стимуляция мезенхимальных стволовых клеток и костномозгового гемопоэза с помощью гранулоцитарного колониестимулирующего фактора при дезадаптации организма // Вестник ЮУрГУ, 2009, № 39, стр. 92-95.
67. Леонова Е.В., Чантурия А.В., Висмонт Ф.И. Патологическая физиология системы крови // Мн.: БГМУ, 2005, 153 с.
68. Леонтьук А.С., Слука Б.А. Основы возрастной гистологии // Уч. пособие. Минск, 2000, 416 с.
69. Лепехова С.А., Каргин А.Г., Гольдберг О.А. и др., Результаты получения неонатальных клеток селезенки новорожденной свиньи для ксенотрансплантации // Сибирский медицинский журнал, 2011, № 6, стр. 124-127.
70. Липунова Е.А., Скоркина М.Ю. Система красной крови: сравнительная физиология // Монография, Белгород: Изд-во БелГУ, 2004, 216 с.
71. Липунова Е.А., Скоркина М.Ю. Физиология крови // моногр. исслед. Липунова Е.А., Скоркина М.Ю., Белгород: Изд-во БелГУ, 2007, 324 с.
72. Лучкин К.Ю., Рудишин О.Ю., Бурцева С.В. Гематологические показатели свиней при применении в их рационе пробиотиков // Вестник Алтайского государственного аграрного университета, 2013, № 3 (101), стр. 69-71.
73. Лызиков А.Н., Осипов Б.Б., Скуратов А.Г., Призенцов А.А. Стволовые клетки в регенеративной медицине: достижения и перспективы // Проблемы здоровья и экологии, 2015, № 3(45), стр. 4-8.

74. Магакян Ю.А., Каралова Е.М. Цитофотометрия ДНК // Из-во НАН РА, Ереван, 1989, 231с.
75. Магакян Ю.А. О периодизации развития животных // Академия наук Армянской ССР, Зоологический институт, Зоологический сборник, XII, 1962, стр. 41-61.
76. Мамукаев М.Н, Арсагов В.А., Тохтиев Т.А. Показатели опороса свиноматок и прироста живой массы подсосных поросят при облучении светом лампы БУВ-30 // Перспективное свиноводство. Теория и практика, 2011, № 3, стр.1-8
77. Мамылина Н.В. Влияние эмоционально-болевого стресса на показатели эритропоэза в костном мозге крыс // Вестник ЧГПУ, 2009, № 4, стр. 320-329
78. Матюшичев В.Б., Шамратова В.Г. Взаимосвязи показателей эритроцитов и лейкоцитов крови при железодефицитной анемии // Вестник СПбГУ. Серия 3, Биология, 2005, № 1, стр. 93-97.
79. Медведев М.А., Коноваленко Ю.А., Кротенко Н.М. Взаимосвязи различной функциональной активности слюнных желез и системы эритрона у белых крыс // Сибирское медицинское, 2007, №2, стр.43-47
80. Медведев С.П., Шевченко А.И., Закиян С.М. Молекулярные основы поддержания самообновления и плюрипотентности эмбриональных стволовых клеток млекопитающих // ACTA NATURAE, 2010, Том 2, №3(6), стр. 38-57.
81. Мелкова К.Н. Аллогенная трансплантация костного мозга: ключевые аспекты и основные этапы развития // Клиническая Онкогематология, 2012, Том. 5, №1, стр. 1-12.
82. Меркулов Г.А. Курс патологистологической техники // Г.А. Меркулов. - Л.: Медицина, 1961, 423 с.
83. Миннебаева Л.Р., Волков А.Х., Ежкова М.С. Сравнительная морфология органов и тканей свиней в зависимости от предубойного воздействия // Ученые записки КГВАМ им. Н.Э. Баумана, 2010, № 201, стр. 272-276.
84. Момот Ю.А. К развитию эмбрионов свиный крупной белой породы // Аграрный Вестник Урала, № 11-2 (77), 2010 г. стр. 36-37.

85. Мороз В.В., Голубев А.М., Афанасьев А.В. и др. Строение и функция эритроцита в норме и при критических состояниях // Общая реаниматология, 2012, VIII; №1, стр. 52-60.
86. Морозова И.В., Трещалина Е.М. Гемостимулирующие свойства гранулоцитарного колониестимулирующего фактора // Российский биотерапевтический журнал, 2005, Том 4, №4, стр. 24-28.
87. Морщакова Е.Ф., Павлов А.Д., Румянцев А.Г. Эритропоэз и его регуляция в эмбриональном, фетальном и неонатальном периодах // Российский вестник перинатологии и педиатрии, 1999, № 3, стр.12-16
88. Моталкина М.С. Современные подходы к улучшению заготовки стволовых кроветворных клеток у онкологических больных при трансплантации // Диссертационная работа на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, 2016, 135с.
89. Никитченко В.Е., Никитченко Д.В. Морфология и онтогенез животных // Вестник РУДН, серия Агротомия и животноводство, 2008, № 4, стр. 19-28.
90. Нимер С.Н. Стволовые клетки // Проблемы здоровья и экологии, Научная библиотека Кибер Ленинка, 2009, № 1 (19), стр. 46-51.
91. Овсянникова О.А., Осипенко М.Д., Карпеева Д.В. Эффекты воздействия серосодержащих газов на эритропоэз на различных этапах онтогенеза // Медицинские науки, Фундаментальные исследования, 2012, №10, стр. 281-284.
92. Овчинников А.А. Воспроизводительные функции свиноматок при использовании в рационе биологически активных добавок // НТП: животноводство и кормопроизводство, Достижения науки и техники АПК, 2013, №1, стр. 45-47
93. Озерной Е.В., Шевченко Б.П. Особенности развития селезёнки свиней породы ландрас // Известия ОГАУ, Научная библиотека, 2014, № 6 (50), стр. 163-165.
94. Павлова А.А., Павлова И.Е., Бессмельцев С.С. Цитокины и их роль в патогенезе множественной миеломы // www.medline.ru Гематология, 2013, Том 14, стр. 313-335.

95. Павлова Т.В., Башук В.В., Прощаев К.И., Башук И.П. Кровь как таргетная система процессов старения // FUNDAMENTAL RESEARCH, 2014, № 7, стр. 1010-1015.
96. Паюшина О.В., Домарацкая Е.И., Старостин В.И. Клеточный состав и регуляторные функции стромы зародышевой печени // Цитология, 2012, Том 54, № 5, стр. 369-380.
97. Петренко Ю.А., Грицай Д.В., Говоруха Т.П., Репин Н.В., Петренко А.Ю. Морфологическое исследование клеточного состава фетальной печени человека // Морфометрія, Вісник проблем біології і медицини, 2010. Вип. 2, стр. 177-183.
98. Подольцева Э.И. Колонiestимулирующие факторы в онкологии // Практическая онкология, 2001, №1(5), стр. 21-24
99. Попов В.С., Самбуров Н.В., Попов А.В. Коррекция метаболизма и иммунного статуса у свиней // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии, 2014, № 2, стр. 67-69.
100. Протопопова Н.В., Гайдунь Н.В., Козлов В.А. Роль антигенактивированных клеток селезенки в регуляции пролиферативной активности стволовой кроветворной клетки костного мозга // Бюллетень СО РАМН, 2007, № 2(124), стр. 10-13.
101. Пудовкин Н.А., Гарипов Т.В., Смутнев П.В. Обмен железа в организме поросят и пути его коррекции // Вестник Алтайского государственного аграрного университета, 2015, № 2 (124), стр. 49-53.
102. Пчельников Д.В. Биокоординационные соединения в кормлении супоросных свиноматок и поросят // Ветеринарная патология, 2010, № 2, стр. 82-85.
103. Ромейс Б. Микроскопическая техника. // Москва, изд-во «Ин. лит», 1953, 718с.
104. Сахаров А.В. Морфологические критерии периодизации роста осевого скелета свиньи // Вестник КрасГау, 2009, № 1, стр. 104-107.
105. Светлов П.Г. Некоторые закономерности в онтогенезе и их отношения к проблеме охраны антенатального периода жизни // Вестник АМН СССР, 1966, № 6, стр. 26-34.

106. Семенова Н.Ю., Бессмельцев С.С., Ругаль В.И. Биология ниши гемопоэтических стволовых клеток // Клиническая онкогематология, 2014; № 7(4), стр. 501–510.
107. Сериков В.Б., Куйперс Ф. Плацента человека как источник гемопоэтических стволовых клеток // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия, 2008, Том 3, № 2, стр. 51-56.
108. Сингина Г.Н., Лопухов А.В., Зиновьева Н.А. Влияние условий искусственной активации на развитие эмбрионов свиней *in vitro* //НТП: животноводство и кормо производство, Достижения науки и техники АПК, 2011, №10, стр. 53-54.
109. Скрышник К.А., Косоруков В.С. Человеческий гранулоцитарный колониестимулирующий фактор в клинической практике // Российский биотерапевтический журнал, РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва, 2011, Том 10, № 2, стр. 19-24.
110. Смоленцев С.Ю. Влияние иммуностимуляторов на формирование иммунитета у свиноматок и поросят // Вестник Марийского государственного университета, 2011, №6, стр. 116-118.
111. Соболева Т.Н., Владимирская Е.Б. Морфология клеток крови в нормальном кроветворении // Методические рекомендации для врачей-лаборантов и гематологов, Москва, Издательство «ЮНИМЕД-пресс», 2003, 32 с.
112. Соколов В.Г. Особенности развития и строения костного мозга у новорожденных, неонатального и молочного периодов поросят // Ветеринарная медицина, 2016, №1, стр. 15-18.
113. Станкова Н.В., Капанадзе Г.Д. Селекционно-генетическая и экспериментальная работа с мини-свиньями светлогорской популяции // Биомедицина, 2012, №1, стр. 49–53.
114. Стёпочкин А.А., Тельцов Л.П., Мордовский ГУ, Зайцева Е.В. Этапы генетического развития свиней крупной белой породы // Известия, ОГАУ, 2014, №1, стр. 62-65.

115. Стрижиков В.К., Сытько В.В., Уральская Г.А. Морфо- и гистохимические аспекты адаптации эритроцитов в крови свиней в ранние фазы постнатального периода онтогенеза // Известия ОГАУ, 2014, №5(49), стр. 98-101.
116. Татоян М.Р. Морфофункциональные особенности развития органов кроветворения в эмбриональном периоде млекопитающих. // Медицинская наука Армении НАН РА, 2016, Том. LVI, №2, стр.74-85.
117. Татоян М.Р. Развитие эритробластических островков печени в онтогенезе свиней // Вопросы теоретической и клинической медицины, 2016, Том19, №3 (106), стр. 34-36.
118. Тельцов Л.П. Здоровье и законы индивидуального развития // Российская Академия Естествознания, www.rae.ru Научный журнал «Фундаментальные исследования», 2007, №6
119. Тельцов Л.П., Романова Т.А., Здоровинин В.А., и др., Вивогенез и критические фазы развития человека и животных // Российская Академия Естествознания www.rae.ru Научный журнал «Фундаментальные исследования», 2008, №12.
120. Тельцов Л.П., Степочкин А.А., Музыка И.Г. Биология развития и законы индивидуального развития человека и животных. // Вестник УГСХА, 2010, №1(11), стр. 86-92.
121. Терлоу С.Л., Добринский Дж.Р. Трансплантация свиных эмбрионов: взгляд в будущее //Перевод статьи - Livestock Link, бюро переводов в сфере животноводства www.linklivestock.ru, 2012.
122. Тихонов В.Н., Бобович В.Е., Запорожец В.И. Создание нового поколения супермелких лабораторных свиней для работы в области медицины, ветеринарии и биотехнологии // Биомедицина, 2011, № 4, стр.37-42.
123. Трошкина Н.А., Циркин В.И., Дворянский С.А. Эритроцит: строение и функции его мембраны (обзор) // Вятский медицинский вестник, 2007, № 2-3, стр 40
124. Трухачев В.И., Злыднев Н.З., Ахмедова А.К., Эффективность применения аскорбиновой кислоты в рационах супоросных и подсосных свиноматок // Достижения науки и техники АПК, 2010, №6, стр. 55-57.

125. Улитко М.В. Роль моноцитов-макрофагов в адаптивных реакциях кроветворной ткани при действии на организм экстремальных факторов // автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук, Екатеринбург, 2008, 25с.
126. Устюгов А.Ю., Румянцев С.А. Модели для изучения биологических свойств гемопозитических стволовых клеток человека // Гены & клетки, 2014, Том IX, №1, стр. 15-22.
127. Уфимцева А.И., Канов Е.В. Характеристика и ex vivo экспансия гемопозитических стволовых и прогениторных клеток пуповинной крови // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия, 2012, Том VII, №4, стр. 21-27.
128. Федоровская Н.С., Дьяконов Д.А., Андреева С.Д., Федоровский А.М., Ковалева Л.К., Зайцев В.Б. Гистологические и морфометрические особенности селезенки у человека и млекопитающих животных // Международный журнал экспериментального образования, 2012, №1, стр. 39-40.
129. Филоненко Е.С., Лагарькова М.А., Киселев С.Л. Перспективы использования плюрипотентных стволовых клеток человека для получения компонентов крови: эритропоэз // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия, 2013, Том VIII, № 2, стр. 6-12.
130. Фомина О.А. Влияние новых комплексных иммуностимуляторов на гематологические показатели свиноматок // Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана, 2012, стр. 301-305.
131. Хохлов А.М., Каряка В.В., и соавт. Особенности пищеварительной системы у домашних и диких свиней // Харьковская государственная зооветеринарна академия, http://www.rusnauka.com/31_NG_2014/Veterenaria/2_179198.doc.htm
132. Хрыщанович В.Я., Третьяк С.И., Глинник А.А. Ксеногенная клеточная терапия: современное состояние проблемы и перспективы свиной клеточной трансплантации // Журнал Гродненского государственного медицинского университета, 2012, № 1, стр. 14-23.

133. Чайлахян Р.К., Герасимов Ю.В. Стволовые клетки костного мозга: экспериментальные исследования и применение в клинике // Медицинская иммунология, СПб РО РААКИ, 2004, Том 6, №3-5, стр. 201-205.
134. Чеснокова Н.П., Моррисон В.В., Понукалина Е.В., и др. Гемопоз и его регуляция на различных стадиях дифференцировки гемопоэтических клеток костного мозга (обзор) // Саратовский научно-медицинский журнал, 2012, Том 8, № 3, стр. 711–719.
135. Чеснокова Н.П., Понукалина Е.В., Чизенкова М.Н. Цикл лекций «Морфофункциональные и метаболические особенности эритроцитов (к разделам «Физиология» и «Биохимия» клеточных элементов периферической крови)» для самостоятельной внеаудиторной работы студентов медицинских вузов // Advances in current natural sciences, 2015, №1, стр. 325-328.
136. Шахов В.П., Кокарев О.В., Попов С.В., Афанасьев С.А., Байков А.Н. Феномен формирования мезенхимальных островков из клеток костного мозга мышей в системе *in vitro* // Экспериментальные и клинические исследования // Бюллетень сибирской медицины, 2004, №1, стр. 60-63.
137. Шахпазян Н.К., Астрелина Т.А., Яковлева М.В. Мезенхимальные стволовые клетки из различных тканей человека: биологические свойства, оценка качества, и безопасности для клинического применения // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия, 2012, Том VII, №1, стр. 23-33.
138. Шевцова Н.М., Зайцев К.В., Кочмала О.Б. Морфофункциональные свойства стромальных стволовых клеток при культивировании *in vitro* в динамических условиях // Бюллетень сибирской медицины, 2009, № 4, стр. 28-33.
139. Шевченко Б.П., Озерной Е.В. Морфологические особенности селезёнки свиней породы ландрас в плодном и раннем постнатальном периодах развития // Известия ОГАУ, 2014, №2, стр. 185-189.

140. Шубина Т.П., Чопорова Н.В. Морфология некоторых лимфоидных органов у свиней в постнатальном онтогенезе // Ветеринарная патология, 2015, №1, стр. 64-68.
141. Юшков Б.Г., Данилова И.Г., Пашнина И.А. и др. Роль макрофагов в регуляции процесса миграции гемопоэтических стволовых клеток в системе костный мозг – периферическая кровь // Медицинская иммунология 2010, Том 12, № 1-2, стр. 7-12 © 2010, СПб РО РААКИ, стр. 7-12.
142. Aglietta M., Pasquino P., Sanavio F., Stacchini A., Severino A., Fubini L., Morelli S., Volta C., Monteverde A., Piacibello W., Gavosto F. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin 3: target cells and kinetics of response in vivo // Stem Cells, 1993 Jul;11 Suppl 2:83-7, DOI: 10.1002/stem.5530110814
143. Aiuti A., Cicchini C., Bernardini S., Fedele G., Amicone L., Fantoni A., Tripodi M. 1998. Hemapoietic support and cytokine expression of murine-stable hepatocyte cell lines (MMH). // Hepatology, 1998, Dec;28(6):1645-54,
144. Alam M.Z., Devalaraja Samir and Malay Haldar The Heme Connection: Linking Erythrocytes and Macrophage Biology // MINI REVIEW, Frontiers in Immunology, www.frontiersin.org, January 2017, Volume 8, Article 33
145. Anatskaya O.V., Vinogradov A.E. Somatic polyploidy promotes cell function under stress and energy depletion: evidence from tissue-specific mammal transcriptome // Funct Integr Genomics. 2010;10(4):433-46
146. Arai F., Hirao A., Suda T. Regulation of hematopoietic stem cells by the niche. // Trends Cardiovasc Med., 2005, Feb;15(2):75-9.
147. Azuma C., Saji F., Kimura T., Tokugawa Y., Takemura M., Miki M., Ono M., Tanizawa O. The gene expressions of macrophage colony-stimulating factor (MCSF) and MCSF receptor in the human myometrium during pregnancy: regulation by sex steroid hormone // J Steroid Biochem Mol Biol. 1991; 39(6):883-8.

148. Azuma C., Saji F., Kimura T., Tokugawa Y., Takemura M., Samejima Y., Tanizawa O. Steroid hormones induce macrophage colony-stimulating factor (MCSF) and MCSF receptor mRNAs in the human endometrium. // *J Mol Endocrinol*. 1990; 5(2):103-8.
149. Barcena A., Muench M.O., Kapidzic Mirhan, Gormley Matthew, Goldfien Gabriel A. and Susan J. Fisher Human placenta and chorion: potential additional sources of hematopoietic stem cells for transplantation// NIH Public Access Author Manuscript Transfusion. 2011 Novemb., 51(Suppl 4): 94S–105S.
150. Barminko J., Reinholt B., Baron M.H. Development and differentiation of the erythroid lineage in mammals. // *Dev Comp Immunol*. 2016, May;58:18-29.
151. Baron M.H. Concise Review: Early Embryonic Erythropoiesis: Not so Primitive After All // *STEM CELLS*, 2013;31:849–856
152. Baron Margaret H., Andrei Vacaru, Johnathan Nieves. Erythroid Development in the Mammalian Embryo // NIH Public Access Author Manuscript Blood Cells Mol Dis. Author manuscript; Blood Cells Mol Dis. December; 51(4): 2013. doi:10.1016/j.bcmed.2013.07.006.
153. Baron M.H., Isern Joan and Stuart T. Fraser. The embryonic origins of erythropoiesis in mammals // *BLOOD*, 24 May, 2012, Volume 119, Number 21, p. 4828-4837.
154. Baumann R., Dragon S. Erythropoiesis and red cell function in vertebrate embryos // *European Journal of Clinical Investigation*, 27 Oct., 2005, Volume 35, Issues 3, p. 2–12
155. Belay E., Hayes B.J., Blau C.A., Torok-Storb B Human Cord Blood and Bone Marrow CD34+ Cells Generate Macrophages That Support Erythroid Islands. // *PLOS ONE* 12(1), 2017: e0171096. doi:10.1371/journal.pone.0171096, 20p.
156. Bethlenfalvai N.C., Block M. Fetal erythropoiesis. Maturation in megaloblastic (yolk sac) erythropoiesis in the C57Bl/6J mouse // *Acta Haematol* 44: (1970). 240-245.
157. Bielańska-Osuchowska Z, Krzynówek-Wojciechowska J. Morphometric investigations of the pig developing liver during the prenatal period // *Pol Arch Weter*. 1990;30(3-4):7-16.
158. Bruijn Marella F.T.R., Nancy A. Speck, Marian C.E. Peeters and Elaine Dzierzak. Definitive hematopoietic stem cells first develop within the major arterial regions of the mouse embryo // *The EMBO Journal*, 2000, Vol 19, No 11, pp. 2465-2474.

159. Burgess A.W., Metcalf D. The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. //Blood, 1980; 56(6):947-58.
160. Chasis J.A. Erythroblastic islands: specialized microenvironmental niches for erythropoiesis. // Curr Opin Hematol. 2006 May; 13(3):137-41.
161. Chasis J.A., Mohandas N. Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis // Blood, 1 august 2008, Volume 112, Number 3 doi: 10.1182/blood-2008- 03-077883.
162. Cumano A, Godin I. Ontogeny of the hematopoietic system. // Annual Rev Immunol. 2007; 25:745-85.
163. David R.B., Sjaastad O.V., Blom A.K., Skogtvedt S., Harbitz I. Ontogeny of erythropoietin receptor mRNA expression in various tissues of the foetal and the neonatal pig. // Domest Anim Endocrinol. 2005;29(3):556-63.
164. David R.B., Blom A.K., Harbitz I., Framstad T., Sjaastad V. Responses of plasma Epo and kidney and liver Epo mRNA to hemorrhage in perinatal pigs. // Domest Anim Endocrinol. 2002 Nov;23(4):507-16.
165. Douglas J.W, Wardrop K.J. Schalm's Veterinary Hematology, 6th Edition. 1232 pages; 2010, Wiley-Blackwell.
166. Dulmovits B.M., Hom J., Narla A., Mohandas N., Blanc L. Characterization, regulation, and targeting of erythroid progenitors in normal and disordered human erythropoiesis. // Current Opinion in Hematology. 2017.24(3):159-166.
167. Dzierzak E., Philipsen S. Erythropoiesis: Development and Differentiation // Cold Spring Harb Perspect Med 2013;3:011601 <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/>
168. Elbers A.R.W., Geudeke M.J., Rossem H. van, M.C. Kroon & C.H.M. Counotte Haematology and biochemistry reference values for sows kept under modern management conditions // Veterinary Quarterly, 1994, 16:2, 127-130, <http://dx.doi.org/10.1080/01652176.1994.9694433>
169. Elliott S., Tomita D., Endre Z. Erythropoiesis stimulating agents and renal-protection: a meta-analysis // BMC Nephrology, 2017;18:14, doi: 10.1186/s12882-017-0438-4

170. Emura I., Sekiya M., Ohnishi Y. Four types of presumptive hemopoietic stem cells in the human fetal liver // *Arch Histol Jpn.* 1983; 46(5):645-62.
171. Emura I., Sekiya M., Ohnishi Y. Ultrastructural identification of the hemopoietic inductive microenvironment in the human embryonic liver. // *Arch. Histol. Jpn.* 1984; 47: 95–112.
172. England S.J., McGrath K.E., Frame J.M., Palis J. Immature erythroblasts with extensive ex vivo self-renewal capacity emerge from the early mammalian fetus // *BLOOD*, 3 March 2011, Volume 117, Number 9 2011 117: 2708-2717 doi:10.1182/blood-2010-07-299743 originally published online December 2, 2010
173. Ferkowicz M.J., Yoder M.C. Blood island formation: longstanding observations and modern interpretations. // *Exp Hematol.* 2005; 33(9):1041-7.
174. Fu J.R., Liu W.L., Zhou Y.F., Zhou J.F., Sun H.Y., Luo L., Zhang H., Xu H.Z. Expansive effects of aorta-gonad-mesonephros-derived stromal cells on hematopoietic stem cells from embryonic stem cells. // *Chin Med J (Engl).* 2005 Dec 5;118(23):1979-86.
175. Fukumoto T. Possible developmental interactions of erythroid cells and hepatocytes in fetal rat liver. // *Biomed. Res.* 1992.13: 385–413.
176. Gaub J., Auer G., Zetterberg A. Quantitative cytochemical aspects of a combined Feulgen-naphthol yellow S staining procedure for the simultaneous determination of nuclear and cytoplasmic proteins and DNA in mammalian cells. *Exp. Cell Res.*, 1975, volume 92, p.323-332
177. Gazaryan K.G., Magakyan Yu.A., Karalova E.M. Avian primary erythropoiesis: accessory pathways of erythrocyte maturation in chick yolk sack. // *Biomed.Biochim. Acta*, 1987, 2/3, p.136-140.
178. Gekas Ch., Rhodes K.E., Van Handel B., et al. Hematopoietic stem cell development in the placenta // *Int J Dev Biol.* 2010; 54(0): 1089–1098. doi:10.1387/ijdb.103070cg.
179. Ghatpane S., Ghatpande A., Sher J., Zile M.H., Evans T. Retinoid signaling regulates primitive (yolk sac) hematopoiesis. *Blood*, 2002, 99(7):2379-2386.
180. Gnanapragasam M.N., Bieker J.J. Orchestration of late events in erythropoiesis by KLF1/EKLF. // *Curr Opin Hematol*, 2017 May;24(3):183-190.

181. Godin I., Cumano A. Of birds and mice: hematopoietic stem cell development. // *Int J, Dev Biol* 2005, 49(2-3):251-257.
182. Golub R., Cumano A. Embryonic hematopoiesis // *Blood Cells Mol Dis.* 2013;51(4): 226-31
183. Gregor H, Egarter C, Levin D, Sternberger B, Heinze G, Leitich H, Reisenberger K. The passage of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor across the human placenta perfused in vitro. // *J Soc Gynecol Investig.* 1999; 6(6):307-10.
184. Guo Y., Zhang J., Zeng Y., Liu W., Geng C., Li K.W., Yang D., Wu S., Wei H., Han Z., Qian X., Jiang Y., He F. Relationship between hematopoiesis and hepatogenesis in the midtrimester fetal liver characterized by dynamic transcriptomic and proteomic profiles // *PLoS ONE*, 2009, 4: e7641.
185. Halvorsen S., Bechensteen A.G. Physiology of erythropoietin during mammalian development. // *Acta Paediatr Suppl.* 2002;91(438):17-26.
186. Heimpel H., Kratt E., Schwarz J., Beneke G. Distribution of haemoglobin content in human red cells, estimated by scanning cytophotometry. // *Klin Wochenschr*, 1977 Dec 1;55(23):1149-57.
187. Hermine O., Dubart A., Porteux F., Mayeux P., Titeux M., Dumenil D., Vainchenker W. Inhibition of the erythropoietin-induced erythroid differentiation by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the human UT-7 cell line is not due to a negative regulation of the erythropoietin receptor // *Blood.* 1996 Mar 1;87(5):1746-53.
188. Hiroaki Hisakawa, Daisuke Sugiyama, Ichiko Nishijima, Ming-jiang Xu, Hong Wu, Kazuki Nakao, Sumiko Watanabe, Motoya Katsuki, Shigetaka Asano, Ken-ichi Arai, Tatsutoshi Nakahata, and Kohichiro Tsuji. Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (hGM-CSF) stimulates primitive and definitive erythropoiesis in mouse embryos expressing hGM-CSF receptors but not erythropoietin receptors // *BLOOD*, 15 December, 2001, Volume 98, Number 13, p. 3618-3626.
189. https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/File:Carnegie_stages_species_comparison.jpg.

190. <http://trimestryberemennosti.ru/plodnoe-jajco/jembrion-bez-zheltochnogo-meshka.html>.
191. Huang X., Cho S. and Spangrude G.J. Hematopoietic stem cells: generation and self-renewal // *Cell Death and Differentiation* (2007), Nature Publishing Group All rights reserved 1350-9047/07, 1851–1859
192. Hübel K., Dale D.C., Liles W.C. Therapeutic use of cytokines to modulate phagocyte function for the treatment of infectious diseases: current status of granulocyte colony-stimulating factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, macrophage colony-stimulating factor, and interferon-gamma. // *J Infect Dis.* 2002;185(10):1490-501.
193. Huber T.L., Kouskoff V., Fehling H.J., Palis J., Keller G., Haemangioblast commitment is initiated in the primitive streak of the mouse embryo. // *Nature*, 2004, 432(7017): 625–630.
194. Ingley E., Tilbrook A.P., Klinken S.P. New Insights into the Regulation of Erythroid Cells // *IUBMB Life*, 56(4): 177–184, April 2004, doi: 10.1080/15216540410001703956
195. Isern J., Fraser S.T., He Z., Baron M.H. The fetal liver is a niche for maturation of primitive erythroid cells. // *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 6;105(18):6662-7.
196. Isern J., Stuart T. Fräsera, Zhiyong Hea, and Margaret H. Barona. Developmental niches for embryonic erythroid cells. // *Blood Cells Mol Dis.* 2010, April 15; 44(4): 207–208. doi:10.1016/j.bcmd.2010.02.008.
197. Jaffredo T., Bollerot K., Sugiyama D., Gautier R., Drevon C., Tracing the hemangioblast during embryogenesis: developmental relationships between endothelial and hematopoietic cells. *Int J Dev Biol*, 2005, 49(2-3):269-277.
198. Jegalian A.G., Acurio A., Dranoff G., Wu H. Erythropoietin receptor haploinsufficiency and in vivo interplay with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin 3. // *Blood.* 2002;99(7):2603-5.
199. Jin-Xiang F., Xiaofeng S., Jun-Chuan Q., Yan G., Xue-Guang Z. Homing efficiency and hematopoietic reconstitution of bone marrow-derived stroma cells expanded by recombinant human macrophage-colony stimulating factor in vitro. // PMID:15588945, 2004.

200. Kabalin Anamaria Ekert, Tomislav Balenović, Ivica Valpotić, Željko Pavičić, and Hrvoje Valpotić. The influence of birth mass and age of suckling piglets on erythrocyte parameters // *Veterinarski arhiv*, 2008, 78 (4), 307-319
201. Kaplan R.N., Psaila B., Lyden D. Niche-to-niche migration of bone-marrow-derived cells. // *Trends in Molecular Medicine*. 2007 Feb;13(2):72-81.
202. Karalova EM, Bakhshinian MZ, Magakian IuA. DNA synthesis and content in the macrophage nuclei of normal mice, during carcinogenesis and during the administration of retinoids to the animals. *Tsitologija*. 1990;32(1):47-53.
203. Kato T., Maekawa S., Nagasawa K., Okui T., Tanizaki Y. A comparative perspective on erythropoiesis. // *Rinsho Ketsueki*. 2016;57(7):925-32.
204. Kawabata H., Sakamoto S., Masuda T., Uchiyama T., Ohmori K., Koeffler H.P., Takaori-Kondo A. Roles of transferrin receptors in erythropoiesis. // *Rinsho Ketsueki*. 2016; 57(7):951-8.
205. Kieusseian Aurelie, Philippe Brunet de la Grange, Odile Burlen-Defranoux, Isabelle Godin, and Ana Cumano Immature hematopoietic stem cells undergo maturation in the fetal liver // *Development* 139, 3521-3530 (2012) doi:10.1242/dev.079210
206. Kingsley P.D., Malik J., Fantauzzo K.A., Palis J. Yolk sac-derived primitive erythroblasts enucleate during mammalian embryogenesis. // *Blood*. 2004, 1; 104(1):19-25.
207. Kritzenberger M., Wrobel K.H. Role of the mesonephros as a transient haematopoietic organ in the bovine embryo // *Anat Histol Embryol*, 2010; 39(6):534-545.
208. Kusakabe Manabu, Hasegawa Kazuteru, Michito Hamada, Megumi Nakamura, Takayuki Ohsumi, Hirona Suzuki. c-Maf plays a crucial role for the definitive erythropoiesis that accompanies erythroblastic island formation in the fetal liver // *Blood*, 4 august 2011 volume 118, number 5, © 2011 by The American Society of Hematology, 2011, 118: 1374-1385 doi:10.1182/blood-2010-08-300400
209. Kyunghee C. The Hemangioblast: A Common Progenitor of Hematopoietic and Endothelial Cells // *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research*, February, 2002, Volume 11,1, p.91-101

210. Lee K. Lydia, Masaya Ueno, Ben Van Handel, and Hanna K.A. Mikkola Placenta as a newly identified source of hematopoietic stem cells // *Curr Opin Hematol.* 2010, July; 17(4): 313–318. doi:10.1097/MOH.0b013e328339f295.
211. Lee S.H., Crocker P.R., Westaby S., Key N., Mason D.Y., Gordon S., Weatherall D.J. Isolation and immunocytochemical characterization of human bone marrow stromal macrophages in hemopoietic clusters. // *J Exp Med.*, 1988;168:1193–1198
212. Li Z., Li L. Understanding hematopoietic stem-cell microenvironments. // *Trends Biochem Sci.* 2006, Oct;31(10):589-95. Epub 2006 Sep 5.
213. Liang R, Ghaffari S. Advances in understanding the mechanisms of erythropoiesis in homeostasis and disease. // *Br J Haematol.* 2016;174(5):661-73.
214. Liu J., Han X., An X. Novel methods for studying normal and disordered erythropoiesis. // *Sci China Life Sci.* 2015; 58(12):1270-5.
215. Liwska J., Grabinski-Baranowski A.J. Ultrastructure of the secondary yolk sac in pig's embryo. // *Folia Morphol (Warsz).* 1994; 53(4):269-83
216. Lu Shi-Jiang, Qiang Feng, Jennifer S. Park, Loyda Vida, Bao-Shiang Lee, Michael Strausbauch, Peter J. Wettstein Biologic properties and enucleation of red blood cells from human embryonic stem cells // *BLOOD*, 1 December 2008, Volume 112, Number 12, 2008 112: 4475-4484, doi:10.1182/blood-2008-05-157198
217. Lux Christopher T., Momoko Yoshimoto, Kathleen McGrath, Simon J. Conway, James Palis, and Mervin C. Yoder All primitive and definitive hematopoietic progenitor cells emerging before E10 in the mouse embryo are products of the yolk sac // *BLOOD* 2008 111: 3435-3438, doi:10.1182/blood-2007-08-107086 originally published online October 11, 2007
218. Malik Jeffrey, Ah Ram Kim, Kaitlin A. Tyre, Anjuli R. Cherukuri, and James Palis Erythropoietin critically regulates the terminal maturation of murine and human primitive erythroblasts // *Haematologica*, 2013; 98(11). 1778-1787.
219. Manwani D., Bieker J.J. The Erythroblastic Island // *Curr Top Dev Biol.* 2008; *Curr Top Dev Biol.* Author manuscript; doi:10.1016/S0070-2153(07)00002-6.

220. Mao X, Shi X, Liu F, Li G, Hu L. Evaluation of erythroblast macrophage protein related to erythroblastic islands in patients with hematopoietic stem cell transplantation. *Eur J Med Res.* 2013; 18:9. doi: 10.1186/2047-783X-18-9.
221. McGrath KE, Kingsley PD, Koniski AD, Porter RL, Bushnell TP, Palis J. Enucleation of primitive erythroid cells generates a transient population of "pyrenocytes" in the mammalian fetus. // *Blood.* 2008 Feb 15;111(4):2409-17.
222. McGrath KE, Catherman SC, Palis J. Delineating stages of erythropoiesis using imaging flow cytometry // 2017, Jan 1;112:68-74. doi: 10.1016/j.ymeth.2016.08.012.
223. McGrath KE, Frame JM, Palis J. Early hematopoiesis and macrophage development. // 2015 Dec; 27(6):379-87. doi: 10.1016/j.smim.2016.03.013. Epub 2016 Mar 25.
224. McGrath KE, Palis J. Hematopoiesis in the yolk sac: more than meets the eye. //2005 Sep;33(9):1021-8.
225. McGrath KE, Palis J. Ontogeny of erythropoiesis in the mammalian embryo. // 10.1016/S0070-2153(07)00001-4 2008.
226. McIver S.C., Katsumura KR, Davids E, Liu P, Kang YA, Yang D, Bresnick EH. Exosome complex orchestrates developmental signaling to balance proliferation and differentiation during erythropoiesis. // *Author information eLife.* 2016;5. pii: e17877.
227. Mikkola H.K., Gekas C., Orkin S.H., Dieterlen-Lievre F. Placenta as a site for hematopoietic stem cell development. // *Exp Hematol.*, 2005, Sep;33(9):1048-54.
228. Mikkola Hanna K., Orkin Stuart H. The journey of developing hematopoietic stem cells // *Rev.Development* 133(19), 3733-3744 (2006), doi:10.1242/dev.02568.
229. Nandakumar SK, Ulirsch JC, Sankaran VG. Advances in understanding erythropoiesis: evolving perspectives. // *Br. J. Haematol.* 2016;173(2):206-18.
230. Nanno M., Hata M., Doi H., Satomi S., Yagi H., Sakata T., Suzuki R., Itoh T. Stimulation of in vitro hematopoiesis by a murine fetal hepatocyte clone through cell-cell contact. // *J. Cell. Physiol.* 1994, 160: 445–454.
231. Nishijima I., Nakahata T., Watanabe S., Tsuji K., Tanaka I., Hirabayashi Y., Inoue T., Arai K. Hematopoietic and lymphopoietic responses in human granulocyte-macrophage colony-

- stimulating factor (GM-CSF) receptor transgenic mice injected with human GM-CSF. // BLOOD, 1997; 90(3):1031-8.
232. Nishikawa M., Tahara T., Hinohara A., Miyajima A., Nakahata T., Shimosaka A. Role of the microenvironment of the embryonic aorta-gonad-mesonephros region in hematopoiesis // *Ann N Y Acad Sci.* 2001, Jun;938:109-16. PMID:11458497.
 233. Nogueira-Pedro A., dos Santos G.G., Oliveira D.C., Hastreiter A.A., Fock R.A., Erythropoiesis in vertebrates: from ontogeny to clinical relevance. // *Front Biosci (Elite Ed).* 2016, Jan 1;8:100-12.
 234. Odlaug T.O. *Laboratory Anatomy of the Fetal Pig* // Publisher: Wm. C. Brown Publishers; 2nd Edition edition (1955), ASIN: B000JC3ZDI, 69p.
 235. Ohata S., Nawa M., Kasama T., Yamasaki T., Sawanobori K., Hata S., Nakamura T., Asaoka Y., Watanabe T., Okamoto H., Hara T., Terai S., Sakaida I., Katada T., Nishina H. Hematopoiesis-dependent expression of CD44 in murine hepatic progenitor cells. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2009, 379: 817–823.
 236. Orkin S.H., Zon L.I. Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology // HHMI Author Manuscript, Published as: *Cell.* 2008, February 22; 132(4): 631–644.
 237. Palis J, Yoder M.C. Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man. // 2001 Aug; 29(8):927-36. 11495698
 238. Palis J. Interaction of the Macrophage and Primitive Erythroid Lineages in the Mammalian Embryo // January 2017, Volume 7, Article 669. p. 1-9. Review published: 09 January 2017 doi: 10.3389/fimmu.2016.00669 [Frontiers in Immunology |www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)
 239. Palis J. Ontogeny of erythropoiesis // *Current Opinion in Hematology: Erythroid system and its diseases:* Edited by Narla Mohandas May 2008, Volume 15, Issue 3, p 155–161 doi: 10.1097/MOH.0b013e3282f97ae1
 240. Palis J. Primitive and definitive erythropoiesis in mammals // Review article published: 28 January 2014 doi: 10.3389/fphys.2014.00003, January 2014, Volume 5, Article 3, 1
 241. Patten B.M. *Embryology of the pig* // By Bradley M. Patten. Third edition, (Pp. i-xiii, 1-352. 35s.). George Allen & Unwin 1948

242. Paulson R.F., Lei Shi, Dai-chen Wu. Stress erythropoiesis: new signals and new stress progenitor cells. // NIH Public Access Author Manuscript *Curr Opin Hematol*. 2011 May; 18(3): 139–145. doi:10.1097/MOH.0b013e32834521c8.
243. Pearson P.L., Klemcke H.G., Christenson R.K., Vallet J.L. Uterine environment and breed effects on erythropoiesis and liver protein secretion in late embryonic and early fetal swine. // *Biol Reprod*. 1998; 58(4):911-8.
244. Petrzilka G.E., Schroeder H.E. Activation of human T-lymphocytes. A kinetic and stereological study. // *Cell Tissue Res*. 1979, 2; 201(1):101-27
245. Pietila I., Vainio S. The embryonic aorta-gonad-mesonephros region as a generator of haematopoietic stem cells. // *APMIS*. 2005 Nov-Dec;113(11-12):804-12.
246. Portilho A.N., Azevedo , Tavares Guedes P., Croy B.A., Pelajo-Machado M. Localization of transient immature hematopoietic cells to two distinct, potential niches in the developing mouse placenta // *Placenta*. 2016 Nov;47:1-11. doi: 10.1016/j.placenta.2016.08.081.
247. Rahmati M., Petitbarat M., Dubanchet S., Bensussan A., Chaouat G., Ledee N. Colony Stimulating Factors 1, 2, 3 and early pregnancy steps: from bench to bedside. // *J Reprod Immunol*. 2015; 109:1-6.
248. Raslova H., Roy L., Vourc'h C., Le Couedic J.P., Brison O., Metivier D., Feunteun J., Kroemer G., Debili N., Vainchenker W. Megakaryocyte polyploidization is associated with a functional gene amplification. // *BLOOD*. 2003;101(2):541-4.
249. Rhodes M.M., Kopsombut P., Bondurant M.C., Price J.O., Koury M.J. Adherence to macrophages in EBIs enhances erythroblast proliferation and increases erythrocyte production by a different mechanism than erythropoietin. // *BLOOD*. 2008; 111: 1700–1708.
250. Robin C., Ottersbach K, de Bruijn M, Ma X, van der Horn K, Dzierzak E. Developmental origins of hematopoietic stem cells // *Oncol Res*. 2003;13(6-10):315-21.
251. Romaniuk A., Lyndina Yu. et al. Structural features of bone marrow Histometrical and three-dimensional analyses of liver hematopoiesis in the mouse embryo. // *Interventional Medicine & Applied Science*, 2016, Volume 8 (3), p. 121–126

252. Sasaki K., Sonoda Y. Histometrical and three-dimensional analyses of liver hematopoiesis in mouse embryo. // Arch.Histol. Cytol., 2000, Volume 63, N2, p137-146
253. Sequeira Lopez M.L, Chernavvsky D.R, Nomasa T, Wall L, Yanagisawa M, Gomez RA. The embryo makes red blood cell progenitors in every tissue simultaneously with blood vessel morphogenesis. // Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2003; 284(4): R1126-37.
254. Shannon L., McKinney-Freeman, Olaia Naveiras, Frank Yates, Sabine Loewer, Marsha Philitas, Matthew Curran, Peter J. Park, and George Q. Daley Surface antigen phenotypes of hematopoietic stem cells from embryos and murine embryonic stem cells // BLOOD, 9 July 2009, Volume 114, Number 2, 114: 268-278.
255. Sheng G. Primitive and definitive erythropoiesis in the yolk sac: a bird's eye view // Int J Dev Biol 2010, 54(6-7):1033-1043.
256. Shi H., Yamamoto S., Sheng M., Bai J., Zhang P., Chen R., Chen S., Shi L., Abdel-Wahab O., Xu M., Zhou Y., Yang F.C. ASXL1 plays an important role in erythropoiesis. // Sci Rep. 2016; 6:28789.
257. Sonoda Y., Sasaki K., Suda M., Itano C., Iwatsuki H. Effects of colchicine on the enucleation of erythroid cells and macrophages in the liver of mouse embryos: ultrastructural and three-dimensional studies. // Anat Rec 1998, 251(3):290-296.
258. Spike B.T., Dibling B.C., Macleod K.F. Hypoxic stress underlies defects in erythroblast islands in the Rb-null mouse. // BLOOD. 2007;110:2173–2181.
259. Steiner R., Vogel H. On the kinetics of erythroid cell differentiation in fetal mice: I. Microspectrophotometric determination of the hemoglobin content in erythroid cells during gestation. // J Cell Physiol, 1973, 81: 323-338.
260. Suda T., Arai F., Hirao A. Hematopoietic stem cells and their niche. // Trends Immunol. 2005, Aug;26(8):426-33.
261. Sugiyama D., Kulkeaw K., Mizuochi C., Horio Y., Okayama S. Hepatoblasts comprise a niche for fetal liver erythropoiesis through cytokine production. // Biochem Biophys Res Commun. 2011, Jul 1;410(2):301-6.

262. Sugiyama D., Tanaka Y., Yumine A., Kojima N. Embryonic regulation of the mouse erythropoietic niche and its clinical application. // 2016, Jul;57(7):944-50. doi: 10.11406/rinketsu.57.944.
263. Tada T., Widayati D. T., Fukuta K. Morphological study of the transition of haematopoietic sites in the developing mouse during the peri-natal period. // Anat Histol Embryol, 2006, 35(4):235-240.
264. Tatoyan M., Karalova E. Hakobyan L. Abroyan L. Avetisyan A. Karalyan N. Karalyan Z. Ontogenesis of the pig erythroid cells //Porcine Research, 2015, Volume 5, Issue 1, p-12-22.
265. Tatoyan M., Karapetyan S., Hakobyan L., Abroyan L., Avetisyan A., Karalova E., Karalyan Z. Ontogenesis of the erythroblastic islands in swine. // Porc Res, 2016, 6(1): 1-9.
266. Tatoyan M., Semergyan Z., Karalyan Z. Association of the maternal colony-stimulating factors with the pig embryos normoblastic erythropoiesis. // Porcine Research, 2016, Volume 6, Issue 1.p.24-30.
267. Tatoyan M.R., Abroyan L. O. Hakobyan L.A., Avetisyan A.S., Karalyan Z.A., Karalova Y.M., 2016 Mesenchymal erythropoiesis in the pig ontogenesis. // Porcine Research, 2016, Volume 6, Issue 2.p.64-71.
268. Tavian M., Peault B., The changing cellular environments of hematopoiesis in human development in utero // Experimental Hematology, 2005, Volume 33, Issue 9, 1062 – 1069.
269. Tober Joanna, Anne Koniski, Kathleen E. McGrath, Radhika Vemishetti, Rachael Emerson, Karen K. L. de Mesy-Bentley, Richard Waugh, and James Palis The megakaryocyte lineage originates from hemangioblast precursors and is an integral component both of primitive and of definitive hematopoiesis // © 2007 by The American Society of Hematology, BLOOD, 15 february, 2007, Volume 109, Number 4, 2007 109: 1433-1441
270. Tsiftoglou S. Asterios, Ioannis S. Vizirianakis and John Strouboulis. Erythropoiesis: Model Systems, Molecular Regulators, and Developmental Programs // ISSN 1521-6543

- print/ISSN 1521-6551 online DOI: 10.1002/iub.226, IUBMB Life, 61(8): 800–830, August, 2009.
271. Tumburu L., Thein S.L. Genetic control of erythropoiesis. // *Curr. Opin. Hematol.* 2017. 24(3):173-182.
 272. Udupa K.B., Sharma B.G. Possible role of tumor necrosis factor-alpha in erythropoietic suppression by endotoxin and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. // *Am J Hematol.* 1996;52(3):178-83.
 273. Vadhan-Raj S., Buescher S., LeMaistre A., Keating M., Walters R., Ventura C., Hittelman W., Broxmeyer H.E., Gutterman J.U. Stimulation of hematopoiesis in patients with bone marrow failure and in patients with malignancy by recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor // *BLOOD.* 1988 Jul;72(1):134-41.
 274. Vallet J.L., Klemcke H.G., R.K. Christenson and P.L. Pearson The effect of breed and intrauterine crowding on fetal erythropoiesis on day 35 of gestation in swine // *American Society of Animal Science*, 2003, 81:2352–2356
 275. Van Hove L., Goossens W., Van Duppen V., Verwilghen R. L. Reticulocyte counting using thiazole orange. A flow cytometry method. // *Clin Lab Haematol* 1990, 12(3):287-299.
 276. Wataru Nunomura, Aurora M. Cianciarullo, Takashi Kato, Ritsuko Shimizu, Malgorzata Witeska. Phylogeny and Ontogeny of Erythropoiesis. // *Biomed. Res. Int.*, 2015, 136270. 21. doi: 10.1155/2015/136270
 277. Wied George L. Introduction to quantitative cytochemistry. // *Cytopathology Service University of Chicago, Illinois.* 1966, Academic press New York and London
 278. Wolber F.M., Leonard E., Michael S., Orschell-Traycoff C.M., Yoder M.C., Srour E.F. Roles of spleen and liver in development of the murine hematopoietic system. // 2002, Sep;30(9):1010-9.
 279. Yoder M.C., Hiatt K. Murine yolk sac and bone marrow hematopoietic cells with high proliferative potential display different capacities for producing colony-forming cells in vitro. // *J hematotherapy Stem Cell Res.*, 1999, Aug.8 (4),p.421-430

280. Yokoyama T., Kitagawa H., Takeuchi T., Tsukahara S., Kannan Y. No apoptotic cell death of erythroid cells of erythroblastic islands in bone marrow of healthy rats. // *J Vet Med Sci.*, 2002;64:913–919.
281. Yokoyama T., Etoh T., Kitagawa H., Tsukahara S., Kannan Y. Migration of erythroblastic islands toward the sinusoid as erythroid maturation proceeds in rat bone marrow. // *J.Vet Med Sci.*, 2003 Apr;65(4):449-52.
282. Yoshimoto Momoko, Encarnacion Montecino-Rodriguez, Michael J. Ferkowicz, Prashanth Porayette, W. Christopher Shelley, Simon J. Conway, Kenneth Dorshkind and Mervin C. Yoder. Embryonic day 9 yolk sac and intra-embryonic hemogenic endothelium independently generate a B-1 and marginal zone progenitor lacking B-2 potential. // www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1015841108// 1468–1473 | PNAS | January 25, 2011 | vol. 108 | no. 4.
283. Zambidis T. Elias, Bruno Peault, Tea Soon Park, Fred Bunz, and Curt I. Civin Hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells progresses through sequential hemoendothelial, primitive, and definitive stages resembling human yolk sac development // *BLOOD*, 1 august 2005, Volume 106, Number 3, p. 860-871.
284. Zhang H., Zhang P., Zhang Y., Yan J., Dong P., Wang Y., Niu X. Effects of erythropoiesis-stimulating agents on heart failure patients with anemia: a meta-analysis. // *Postepy Kardiol Interwencyjnej.* 2016;12(3):247-53.