

© В. Ф. Иванова, 2013
УДК 611.013:611.38.018.1:599.323.4

В. Ф. Иванова

ВЗАИМООТНОШЕНИЯ ЯДЕРНОЙ ОБОЛОЧКИ И ОРГАНЕЛЛ КЛЕТОК БРЮШИНЫ В ОНТОГЕНЕЗЕ И ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИИ

Отдел электронной микроскопии (зав. — д-р мед. наук В. Ф. Иванова), Центральная научно-исследовательская лаборатория (зав. — д-р мед. наук И. Ш. Якубова), кафедра медицинской биологии (зав. — д-р мед. наук С. В. Костюкевич), Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова, Санкт-Петербург

Методом электронной микроскопии изучена висцеральная и париетальная брюшина белых мышей как в процессе онтогенеза, так и при ее повреждении, вызванном введением в полость 0,5% раствора новокаина. На ранних этапах внутриутробного развития (13 сут) большая часть мезотелиоцитов и мезенхимных клеток содержат в цитоплазме в основном свободные рибосомы (полисомы), другие органеллы единичны и расположены вблизи ядерной оболочки. В дальнейшем количество мембранных органелл увеличивается, а полисом — снижается. При повреждении мезотелия через 1 сут по краю раневой поверхности появляются малодифференцированные мезотелиоциты, цитоплазма которых содержит многочисленные полисомы. В этих клетках обнаруживаются выпячивания мембран ядерной оболочки и их связь с мембранными органеллами (эндоплазматическая сеть, комплекс Гольджи, митохондрии). Наблюдаемое взаимоотношение ядерной оболочки с мембранными органеллами цитоплазмы рассматривается как возможный способ их образования в малодифференцированных клетках. Редкая встречаемость данного явления у взрослых животных при патологии и отсутствие его в условиях физиологической регенерации рассматривается как проявление закона гистогенетических рекапитуляций.

Ключевые слова: эпителий, ядерная оболочка, мембранные органеллы

Работ, посвященных дифференцировке клеток серозных оболочек в период внутриутробного развития и при патологии, выполненных с применением метода электронной микроскопии, опубликовано немного [3–5, 17]. В этих исследованиях вопрос о взаимоотношении ядерной оболочки и мембранных органелл мезотелиоцитов не рассматривался, однако, он представляет интерес в связи с решением проблемы об образовании этих органелл в онтогенезе. Связь эндоплазматической сети с наружной ядерной мембраной и идентичность их биохимического состава описаны во многих работах, и эти данные фигурируют в современной литературе [1, 2, 14, 18]. Во время митоза ядерная оболочка на поздней стадии профазы распадается на пузырьки, которые переходят в цитоплазму, и восстанавливается из эндоплазматической сети при формировании дочерних ядер [11–13]. Сложнее вопрос о взаимоотношении ядерной оболочки с митохондриями и элементами комплекса Гольджи [10]. Воспроизведение митохондрий осуществляется путем их деления или почкования. Комплекс Гольджи не имеет рибосом и, следовательно, не может синтезировать свои мембранные структуры, расходуемые при функционировании. Регенерация его цистерн напрямую зависит от отделения пузырьков от эндоплазмати-

ческой сети и переноса их к наружным стопкам комплекса Гольджи [10, 19].

Цель настоящей работы — изучение взаимоотношения ядерной оболочки и мембранных органелл цитоплазмы мезотелиоцитов и фибробластов париетальной и висцеральной брюшины в процессе их дифференцировки на протяжении пре- и постнатального онтогенеза и при патологии.

Материал и методы. Работа выполнена на белых беспородных мышках в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (приложение к приказу № 755 от 02.08.1977 г. МЗ СССР). Исследованы париетальная и висцеральная (на поверхности тонкой кишки) брюшина 15 зародышей белых мышей на 11-, 12-, 13-, 15-, 18-е сутки развития и 6 мышей в возрасте 1 и 45 сут. У 30 самцов мышей повреждение брюшины вызывали введением в ее полость 0,6 см³ 0,5% раствора новокаина. Животных умерщвляли через 20, 60 мин, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 12 сут. Материал фиксировали в 2,5% растворе глутаральдегида и 1% растворе четырехоксида осмия, заливали в аралдит М. Ультратонкие срезы получали на ультратоме LKB-111 (Bromma, Швеция), контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и изучали в электронном микроскопе JEM-100S (Jeol, Япония). Для количественной характеристики процессов дифференцировки мезотелиоцитов на электронных микрофотографиях определяли число различных органелл. При этом использовали сетку, разделенную на квадраты (1,5×1,5 см²), которую накладывали на электронные микрофотографии (ув. 15000–20000) мезотелиоцитов [16]. У каждого животного исследовали

Сведения об авторах:

Иванова Валентина Федоровна (e-mail: cnil22@mail.ru), отдел электронной микроскопии, Центральная научно-исследовательская лаборатория, Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова, 191015, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, 41

по 10–15 клеток. На каждой фотографии подсчет органелл проводили в 10–20 квадратах. Протяженность мембран гранулярной эндоплазматической сети определяли с помощью курвиметра КУ-А (Измерительные системы, Россия). Затем полученные результаты переводили в истинные величины, приходящиеся на 1 мкм² площади цитоплазмы. Оценку статистической значимости результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента, различия считали значимыми при $P \leq 0,05$.

Результаты исследования. На 11–12-е сутки эмбрионального развития мышей выстилка вторичной полости тела представлена отростчатыми клетками, среди которых не удастся идентифицировать элементы будущего мезотелия и мезенхимы.

На 13-е сутки эмбриогенеза в обоих листках брюшины отчетливо видна базальная мембрана, отделяющая мезотелий от мезенхимы. Основным различием в ультрамикроскопической организации мезотелиоцитов, покрывающих как париетальную, так и висцеральную брюшину, является количество в их цитоплазме свободных рибосом и других органелл, которое зависит от асинхронности, их дифференцировки. Большая часть клеток в составе мезотелиального пласта представлена малодифференцированными элементами, которые содержат в цитоплазме в основном свободные рибосомы (полисомы), другие органеллы (митохондрии, комплекс Гольджи, эндоплазматическая сеть) единичны и расположены чаще всего вблизи ядра (рис. 1, а).

В висцеральной брюшине на 13-е сутки эмбрионального развития, в мезотелиоцитах с преобладанием свободных рибосом, на 1 мкм² цитоплазмы приходится 130 ± 4 полисом, а остальных органелл — $1,62 \pm 0,04$. В другой разновидности мезотелиоцитов свободных рибосом на 1 мкм² — 66 ± 3 , а других органелл — $2,92 \pm 0,04$. В париетальной брюшине у мышей этого срока развития указанные выше показатели следующие: в менее дифференцированных мезотелиоцитах на 1 мкм² цитоплазмы свободных рибосом — $118,5 \pm 2,0$, мембранных органелл — $3,2 \pm 0,6$, а в более дифференцированных соответственно — $68,1 \pm 2,3$, и $3,2 \pm 0,6$. В дальнейшем количество органелл изменяется: уменьшается число свободных рибосом, мембранных органелл — увеличивается. У новорожденных мышей в мезотелиоцитах висцеральной брюшины свободных рибосом на 1 мкм² приходится $36,5 \pm 1,8$, а мембранных органелл — $4,60 \pm 0,21$, в париетальной брюшине соответственно — $33,0 \pm 2,3$, и $2,91 \pm 0,04$. Различия содержания органелл мезотелиоцитов, выявленные в париетальной и висцеральной брюшине, отражают не только асинхронность дифференцировки этих клеток в составе эпителиального

пласта, но и опережающую их специализацию в париетальной брюшине.

На 15-е сутки развития в малодифференцированных мезотелиоцитах большая часть цитоплазмы занята свободными рибосомами, ядерная оболочка образует выросты, преимущественно, за счет наружной мембраны, которые в виде узких трубчатых образований (см. рис. 1, д) отходят от ядра на значительное расстояние. Иногда наружная ядерная мембрана образует выпячивание в виде разветвленной цистерны (см. рис. 1, г), которая занимает значительный участок цитоплазмы. Такие цистерны заполнены мелкозернистым веществом умеренной электронной плотности. Крайне редко встречаются выпячивания внутренней ядерной мембраны. На рис. 1, б показан вырост наружной и внутренней мембран ядерной оболочки, который доходит почти до апикальной части плазмолеммы мезотелиоцита. Внутри основания этого выроста расположено небольшое количество гетерохроматина. Иногда в клетках наблюдается связь ядерной оболочки с комплексом Гольджи. На рис. 1, в видно, что ядерная оболочка на небольшом участке распадается на мелкие гладкие пузырьки, которые находятся в контакте с элементами комплекса Гольджи.

На 13-е сутки развития под мезотелием расположены отростчатые мезенхимные клетки, образующие сеть, цитоплазма которых содержит большое количество свободных рибосом, немногочисленные мелкие округлые митохондрии, единичные каналы гранулярной эндоплазматической сети и крайне редко встречающийся слабо развитый комплекс Гольджи. В мезенхимных клетках также встречаются выросты наружной ядерной мембраны в виде длинных узких образований (рис. 2, а). Волокнистых компонентов межклеточного вещества на данной стадии развития брюшины не обнаружено.

На 15-е сутки в мезенхиме наблюдается дифференцировка ее клеток, в результате которой в их цитоплазме увеличивается протяженность гранулярной эндоплазматической сети, цистерны которой заполнены мелкогранулированным веществом умеренной электронной плотности. Клетки теряют связь между собой и приобретают удлинённую форму. В это время появляется межклеточное вещество, содержащее коллагеновые фибриллы, расположенные вблизи малодифференцированных фибробластов (см. рис. 2, б). В цитоплазме некоторых фибробластов находятся коллагеновые протофибриллы (см. рис. 2, в). Перинуклеарное пространство резко расширено и иногда занимает значительную часть цитоплазмы, окружая митохондрии (см. рис. 2, г). В неко-

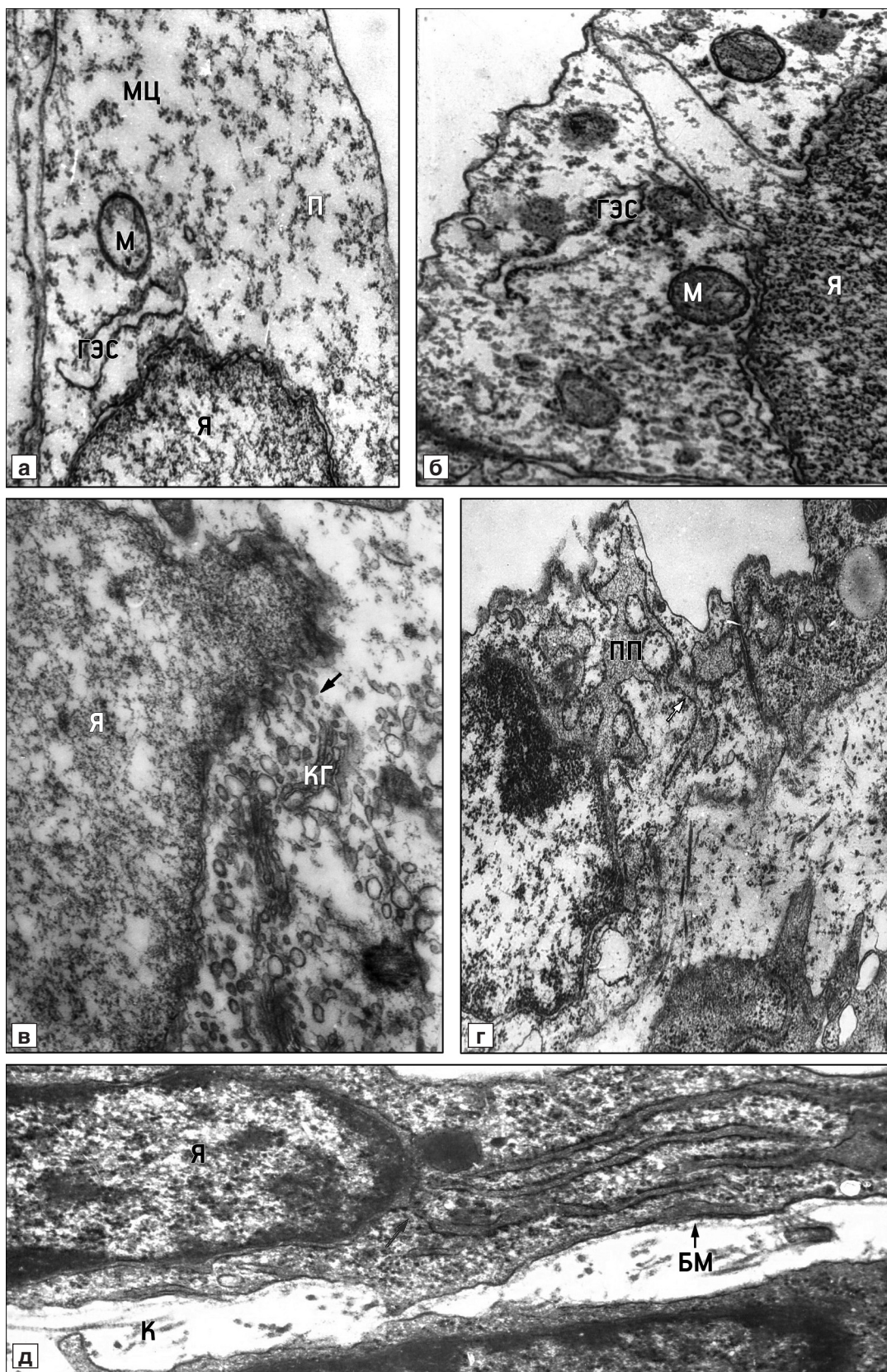


Рис. 1. Мезотелиоциты висцеральной (а–г) и париетальной (д) брюшины мышей на 13-е (а, б) и 15-е (в–д) сутки внутриутробного развития.

Стрелки — выросты ядерной оболочки и их связь с мембранными органеллами; Я — ядро; М — митохондрия; КГ — комплекс Гольджи; ГЭС — гранулярная эндоплазматическая сеть; БМ — базальная мембрана; К — коллагеновые фибриллы; ПП — перинуклеарное пространство; П — полисомы; МУ — мезотелиоцит. Ув.: а — 26 000; б, в — 36 000; г, д — 32 000

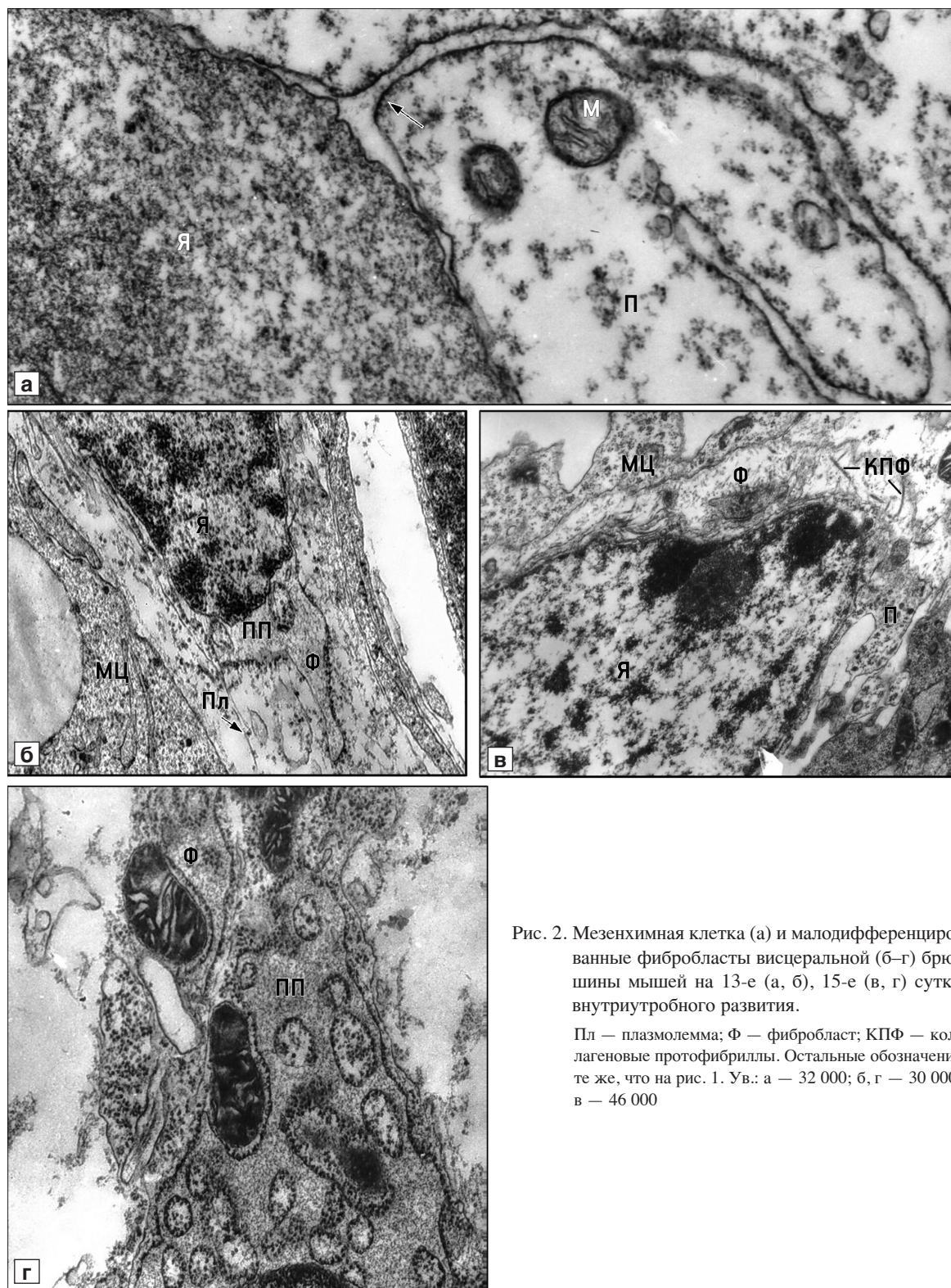


Рис. 2. Мезенхимная клетка (а) и малодифференцированные фибробласты висцеральной (б–г) брюшины мышей на 13-е (а, б), 15-е (в, г) сутки внутриутробного развития.

Пл — плазмолемма; Ф — фибробласт; КПФ — коллагеновые протофибриллы. Остальные обозначения те же, что на рис. 1. Ув.: а — 32 000; б, г — 30 000; в — 46 000

торых клетках плазмолемма прослеживается не на всем ее протяжении, а ядро окружено ядерной оболочкой, наружная мембрана которой образует выросты. Цитоплазма этих клеток содержит единичные полисомы и одиночные коллагеновые протофибриллы (см. рис. 2, в). В последующие сроки внутриутробного развития количество межклеточного вещества нарастает. Довольно

часто встречаются малодифференцированные фибробласты, в цитоплазме которых находятся многочисленные коллагеновые протофибриллы. К 21-м суткам межклеточное вещество представлено эластическими волокнами и пучками коллагеновых волокон.

После рождения изменений в строении и количественном содержании органелл в мезотелиоци-

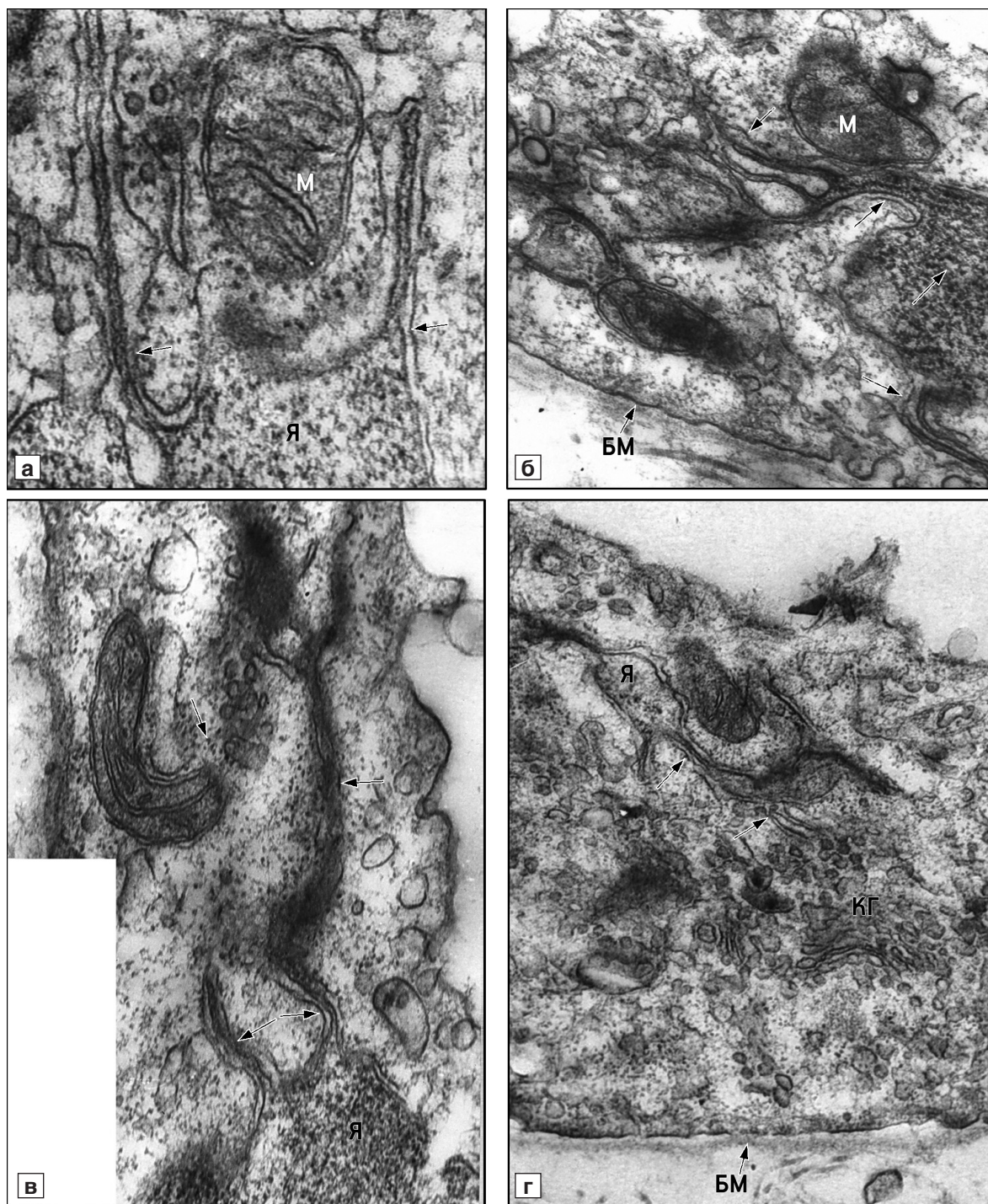


Рис. 3. Мезотелиоциты париетальной брюшины мышей через 1 сут (а, г) и 2 сут (б, в) после введения в полость брюшины новокаина.

Обозначения те же, что на рис. 1. Ув.: а — 72 000; б-г — 34 000

тах не обнаружено. Имеет место только увеличение содержания пиноцитозных пузырьков. Если на 18-е сутки в мезотелиоцитах висцеральной брюшины на 1 мкм^2 их приходится $2,20 \pm 0,21$, а в париетальной — $1,31 \pm 0,10$, то на 45-е сутки постнатального периода — соответственно $7,9 \pm 0,4$ и $8,10 \pm 0,10$. В соединительной ткани наблюдается дальнейшее увеличение содержания коллагеновых и эластических волокон и уменьшение коли-

чества клеток. К 45-м суткам париетальная и висцеральная брюшина (мезотелий и соединительная ткань) приобретают строение, характерное для такового у половозрелых животных.

Введение в полость брюшины 0,5% новокаина сопровождалось развитием в мезотелиоцитах обоих ее листков дистрофических изменений уже через 20 мин. Измененные клетки располагались одиночно или группами. Многие из них через

24 ч от начала опыта слущивались, и на поверхности брюшины были видны различной величины участки, лишенные мезотелиального покрова, на поверхности которых располагались лимфоциты и макрофаги.

К концу 1-х суток изменения в мезотелиоцитах, сохранившихся по краю повреждения, различались. Ядра и органеллы одних мезотелиоцитов были набухшими. Другая часть клеток была представлена большими элементами, имевшими крупное ядро и цитоплазму с многочисленными и равномерно распределенными органеллами. У клеток третьей разновидности значительная часть цитоплазмы была занята свободными рибосомами. Различия в строении мезотелиоцитов, сохраняясь на протяжении всего опыта, были более выражены на протяжении первых 3 сут. В клетках, содержащих в цитоплазме многочисленные свободные рибосомы, наблюдались выросты ядерной оболочки в цитоплазму. Они могли быть представлены или только наружной ядерной мембраной, или наружной и внутренней мембранами (рис. 3, а, б).

Эти выросты иногда образовывали многочисленные разветвления и были заполнены глыбками хроматина, прилежащими к внутренней ядерной мембране (ламина). Выпячивания третьей разновидности были образованы только внутренней ядерной мембраной с ламиной. Некоторые такие выпячивания находились в контакте с цистернами комплекса Гольджи (см. рис. 3, г). Связь ядерной оболочки (ее внутренней мембраны) с митохондриоподобной структурой удалось проследить только в одной клетке. Это образование отличалось от митохондрий, характерных для мезотелиоцитов, размером и внутренней мембраной, кривизной которой располагались не поперечно или под углом к оболочке митохондрии, а параллельно ее длине (см. рис. 3, в).

На 2–3-и сутки в мезотелии по краю раны увеличивалось содержание митотически делящихся клеток, и на 5–8-е сутки целостность мезотелиального покрова восстанавливалась. Новообразованный мезотелий отличался от интактного наличием митотически делящихся клеток и крупных одноядерных клеток, содержащих в цитоплазме многочисленные органеллы. На 12-е сутки эпителиальный покров брюшины на поверхности повреждения отличался от контроля только наличием единичных фигур митоза.

Обсуждение полученных данных. Вопрос о взаимоотношении ядерной оболочки с мембранными органеллами клетки в литературе рассматривается с позиции их образования, начиная с перехода протоклеточной организации к клеточной, когда произошло обособление ядра и воз-

никновение ядерной оболочки [20]. Большинство исследователей склоняются к тому, что на ранних этапах филогенеза эукариот (грибы, аннелиды) и у растений мембранные органеллы образуются из материала ядерной оболочки и хроматина, прилежащего к ее внутренней мембране [9, 15, 18, 20]. Существует также мнение о самосборке митохондрий и комплекса Гольджи в малодифференцированных клетках за счет полисом, обеспечивающих синтез белков, необходимых для образования мембран [20].

Однако при решении вопроса об участии ядерной оболочки в образовании органелл у позвоночных, когда на протяжении жизненного цикла клетки и особенно при митотическом делении формируются сложные взаимоотношения между мембранными структурами клеток, нет четкого представления. В работах, опубликованных по этому вопросу, связь ядерной оболочки прослежена только в отношении эндоплазматической сети во время митотического деления и при цитогенезе в физиологических и патологических условиях [2, 14]. Обновление же митохондрий осуществляется в результате их деления или почкования, а восстановление элементов комплекса Гольджи — за счет пузырьков, отделяющихся от эндоплазматической сети [1, 10]. Д. Рудин и Д. Уилки [8], описывая образование митохондрий путем их деления, однако, считают, что имеются генетические данные возможного участия ядра в их образовании. Связь ядерной оболочки с митохондриями и комплексом Гольджи в период эмбриогенеза описана в клетках печени 13-суточных крысят [6].

При изучении париетальной и висцеральной брюшины на ранних стадиях эмбриогенеза, когда начинается специализация ее покровного эпителия и соединительнотканной основы, было установлено, что в большинстве клеток мезотелия и мезенхимы основная часть цитоплазмы занята свободными рибосомами, а эндоплазматическая сеть, митохондрии и комплекс Гольджи единичны, небольшого размера и располагаются вблизи ядра, нередко сохраняя с ним связь. На этой стадии специализации в клетках довольно часто наблюдаются выпячивания наружной ядерной мембраны, которые отходят от ядра на значительное расстояние и имеют вид узких длинных трубчатых образований или широких разветвленных полостей. Комплекс Гольджи нередко сохраняет связь с ядерной оболочкой.

Особый интерес представляет дифференцировка мезенхимных клеток, когда начинает формироваться межклеточное вещество. При этом в процессе образования коллагеновых волокон количество цитоплазмы уменьшается, и в соединительной ткани видны клетки, содержащие ядра

практически лишенные окружающей их цитоплазмы или ограниченные лишь разросшейся наружной ядерной мембраной.

Описанные выше наблюдения дают основание предполагать, что в период раннего эмбрионального развития в мезотелиоцитах и малодифференцированных фибробластах ядерная оболочка участвует в образовании мембранных органелл.

В условиях экспериментальной патологии, вызванной введением в полость брюшины 0,5% раствора новокаина, также была выявлена связь ядерной оболочки с комплексом Гольджи и митохондриями. Подобные явления встречались крайне редко, а при воздействии других раздражителей на мезотелий обнаружены не были [5].

Если оценить отмеченные в литературе [9, 15, 18–20] наблюдения связи ядерной оболочки с мембранными органеллами (эндоплазматическая сеть, митохондрии, комплекс Гольджи) на ранних этапах филогенеза и ее исчезновение у более высоко организованных животных и с появлением у последних этой связи в период раннего эмбриогенеза и при патологии, то можно полагать, что это явление представляет собой одно из проявлений закона гистогенетических рекапитуляций [7], составляющих основу эволюционной изменчивости гистогенеза.

ЛИТЕРАТУРА

- Боровая Т. Г. и Данилов Р. К. Основы учения о клетке — структурно-функциональной единице тканей. В кн.: Руководство по гистологии, СПб., СпецЛит, 2011, т. 1, с. 23–80.
- Губанова Н. В. и Киселева Е. В. Структурная организация и функция ядерной оболочки. Цитология, 2007, т. 49, № 4, с. 258–269.
- Иванова В. Ф. Строение париетальной и висцеральной брюшины белых мышей. Арх. анат., 1970, т. 59, вып. 9, с. 44–52.
- Иванова В. Ф. Эмбриональное и постэмбриональное развитие париетальной и висцеральной брюшины белых мышей. Арх. анат., 1975, т. 68, вып. 6, с. 45–53.
- Иванова В. Ф. Дифференцировка клеток мезотелия при его репаративной регенерации. Арх. анат., 1979, т. 77, вып. 10, с. 39–47.
- Калашникова М. М. Характеристика морфологической дифференцировки гепатоцитов животных различных классов в онтогенезе в зависимости от особенностей питания. Бюл. экпер. биол., 1997, т. 123, № 1, с. 4–10.
- Кнорре А. Г. Эмбриональный гистогенез (морфологические очерки). Л., Медицина, 1971.
- Рудин Д. и Уилки Д. Биогенез митохондрий. М., Мир, 1970.
- Фрей-Висселинг А. и Мюлеталер Л. Ультраструктура растительной клетки. М., Мир, 1968.
- Хэм А. и Кормак Д. Цитоплазма и органеллы. В кн.: Гистология, М., Мир, 1982, т. 1, с. 75–116.
- Anderson D. J. and Hetzer M. W. Shaping the endoplasmic reticulum into the nuclear envelope. J. Cell Sci., 2008, v. 121, p. 137–142.
- Burke B. and Ellenberg J. Remodeling the walls of the nucleus. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2002, v. 3, p. 487–497.
- Burke B. and Stewart C. L. Life at the edge: the nuclear envelope and human disease. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2002, v. 3, p. 575–578.
- Fricker M., Hollinshead M., Whyte N. and Vaux D. Interphase nuclei of many mammalian cell types contain deep, dynamic, tubular membrane-bound invaginations of the nuclear envelope. J. Cell Biol., 1997, v. 136, p. 531–544.
- Hoffman H. and Grigg G. W. An electron microscopic study of mitochondria formation. Exp. Cell Res., 1958, v. 15, p. 118–131.
- Loud A. B., Barany W. C. and Pack B. A. Quantitative evaluation of cytoplasmic structures in electron micrographs. Lab. Invest., 1965, v. 14, p. 996–1008.
- Michailova K. N. Development of the human fetal visceral pleura. An ultrastructural study. Ann. Anat., 1996, v. 178, p. 91–99.
- Moir R. D., Spann T. P. and Goldman R. D. The dynamic properties and possible functions of nuclear lamins. Int. Rev. Cytol., 1995, v. 162, p. 141–182.
- Moore R. T. and McAltair J. H. Fine structure of mycota 4. The occurrence of the Golgi dictyosome in the fungus *Neobulgaria pura* (Fr.) Petrak. J. Cell Biol., 1963, v. 16, p. 131–141.
- Stang-Voss C., and Staubesand J. New formation of mitochondria: electron microscopic studies on spermatides of *Eisenia foetida* (Annelidae). Z. Zellforsch Mikrosk. Anat., 1970, Bd. 111, H. 1, S. 127–142.

Поступила в редакцию 09.12.2012

INTERRELATION OF NUCLEAR ENVELOPE WITH CELL ORGANELLES IN PERITONEAL CELLS DURING ONTOGENESIS AND IN EXPERIMENTAL PATHOLOGY

V. F. Ivanova

Visceral and parietal peritoneum was studied by electron microscopy in albino mice both in the process of ontogenesis and after its injury induced by the intraperitoneal injection of 0.5% novocaine solution. It was shown that during the early stages of intrauterine development (Day 13) most of the mesotheliocytes and mesenchymal cells contained predominantly free ribosomes (polysomes) in their cytoplasm while other organelles were rare and were located near the nuclear envelope. Subsequently, the number of membranous organelles increased while that of polysomes decreased. One day after the injury of the mesothelium, undifferentiated mesotheliocytes containing numerous polysomes in their cytoplasm appeared at the margin of wound surface. In these cells the protrusion of membranes of nuclear envelope and their association with the membranous organelles (endoplasmic reticulum, Golgi complex, mitochondria) were detected. The observed interrelations between the nuclear envelope and the membranous cytoplasmic organelles is considered to be a possible way of their formation in the undifferentiated cells. Rare occurrence of this phenomenon in adults animals under the pathological condition and its absence during the physiological regeneration is considered as a manifestation of the law of histogenetic recapitulation.

Key words: *epithelium, nuclear envelope, membranous organelles*

Department of Electron Microscopy, Central Scientific Research Laboratory. Department of Medical Biology, North-Western I. I. Mechnikov State Medical University, St. Petersburg