

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Научная статья

УДК 576+591.3

doi: 10.19163/1994-9480-2022-19-1-123-128

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ МЕЗЕНХИМАЛЬНО-ЭПИТЕЛИАЛЬНОГО И ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОГО ПЕРЕХОДОВ В ЭМБРИОНАЛЬНОМ И ПОСТНАТАЛЬНОМ МОРФОГЕНЕЗЕ ПЕЧЕНИ

И.А. Дворяшина¹, Ю.И. Великородная², А.В. Терентьев¹, В.Л. Загребин¹

¹ Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия

² Волгоградский медицинский научный центр, Волгоград, Россия

Автор, ответственный за переписку: Ирина Александровна Дворяшина, germionna@yandex.ru

Аннотация. Процессы мезенхимально-эпителиального и эпителиально-мезенхимального переходов связаны с эмбриональным развитием, дифференцировкой тканей и регенерацией. Чтобы определить, происходят ли мезенхимально-эпителиальный и эпителиально-мезенхимальный переходы в морфогенезе печени, проанализировали ткани печени крыс от 10-го дня эмбрионального развития до взрослых особей. Результаты иммуногистохимического исследования показали, что по мере развития печени экспрессия эпителиального маркера (цитокератина 18) увеличивается, в то время как экспрессия мезенхимального маркера (виментина) снижается, за исключением периода с 1-го по 17-й день после рождения, когда количество виментина возрастает. Выявили иммуногистохимические признаки эпителиально-мезенхимального и мезенхимально-эпителиального переходов на стадиях гепатогенеза.

Ключевые слова: печень, гепатогенез, эпителиально-мезенхимальный переход, мезенхимально-эпителиальный переход, виментин, цитокератин 18, гепатобласт

ORIGINAL RESEARCHES

Original article

IMMUNOHISTOCHEMICAL EVIDENCES OF MESENCHYMAL-EPITHELIAL AND EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITIONS IN EMBRYONIC AND POSTNATAL LIVER MORPHOGENESIS

I.A. Dvoryashina¹, Yu.I. Velikorodnaya², A.V. Terentyev¹, V.L. Zagrebina¹

¹ Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia

² Volgograd Medical Research Center, Volgograd, Russia

Corresponding author: Irina A. Dvoryashina, germionna@yandex.ru

Abstract. The processes of mesenchymal-epithelial and epithelial-mesenchymal transitions are associated with embryonic development, tissue differentiation and regeneration. We have analyzed liver tissue in rats from day 10 of embryonic development to adults to prove mesenchymal-epithelial and epithelial-mesenchymal transitions in liver morphogenesis. The immunohistochemical study showed that during the liver development expression of the epithelial marker (cytokeratin 18) increases, while the expression of the mesenchymal marker (vimentin) decreases, with the exception of the period from 1 to 17 days after birth, when the amount of vimentin increases. Revealed immunohistochemical evidences of epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions at the stages of hepatogenesis.

Keywords: liver, hepatogenesis, epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, vimentin, cytokeratin 18, hepatoblast

Последние 20 лет активно изучается вопрос морфогенеза печени, что способствовало пониманию патогенеза многих заболеваний органа [1]. Понимание того, как этот сложный орган развивается во время

эмбриогенеза, поможет разработать новые подходы к лечению заболеваний печени.

Гепатоциты составляют 78 % объема печени млекопитающих [2] и вместе с холангиоцитами

представляют эпителиальный росток клеток в этом органе. К мезенхимальным клеткам печени относят синусоидальные эндотелиоциты, перисинусоидальные клетки печени, клетки Купфера и пит-клетки. Хотя большинство исследований традиционно сосредоточено на гепатоцитах, становится ясно, что негепатоцитарные типы клеток вносят решающий вклад в функцию и патологию печени, и усилия по пониманию их эмбрионального происхождения и механизмов их развития активизировались [3].

Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) и его обратный процесс мезенхимально-эпителиальный переход (МЭП) – фундаментальные эволюционно консервативные механизмы, используемые на разных стадиях морфогенеза и органогенеза многоклеточных [4]. ЭМП включает прогрессирующую потерю полярности эпителиальных клеток, реорганизацию актинового цитоскелета, чтобы придать миграционный фенотип клеткам, которые дадут рост зародышевым листкам, а затем и тканям [5]. МЭП – это прогрессивное фенотипическое изменение от слабо связанных подвижных клеток к плотно связанным клеткам с отчетливой апикально-базальной полярностью, фундаментальный клеточный процесс, лежащий в основе ряда процессов развития, регенерации и патологии [6].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Определить иммуногистохимические признаки мезенхимально-эпителиального и эпителиально-мезенхимального переходов в эмбриональном и постнатальном периодах развития печени.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Дизайн эксперимента. Исследование проводили на белых беспородных крысах массой 200–250 г. При постановке экспериментов руководствовались международными принципами гуманного обращения с животными, национальным законом и рекомендациями локального этического комитета. Крыс содержали в клетках по 8 особей в каждой в помещениях с искусственным освещением при 20–22 °С в условиях свободного доступа к воде и пище.

Для исследования морфофункциональной характеристики клеток печени крыс на различных этапах онтогенеза производили забор образцов печеночной ткани на 10-й и 17-й день эмбрионального (*антенатального*) периода развития, а также в 1-й и 14-й дни постнатального периода развития животных. В качестве контроля служили образцы печени взрослых лабораторных крыс.

Иммуногистохимический метод исследования. Парафиновые срезы образцов тканей толщиной 5 мкм для иммуногистохимического исследования монтировали на стекла, обработанные поли-L-лизинном (Menzel). Для определения локализации Цитокератина-18 применяли кроличьи моноклональные (С-04) антитела (Novusbio, Канада), для изучения виментина – кроличьи моноклональные (V9) антитела (Invitrogen, США). Для блокирования эндогенной пероксидазы срезы инкубировали 20 минут в 3 % перекиси водорода. Постановку иммуногистохимических реакций проводили с помощью пероксидаза-полимерной системы визуализации по стандартному протоколу производителя (Dako, США). Демаскировку антител осуществляли путем кипячения срезов при 100 °С в цитратном буфере (pH = 6,0) в течение 10 минут. Пероксидазу проявляли 3-3-диаминобензидином из набора протокола. На заключительном этапе реакции срезы докрашивали гематоксилином Майера. Негативным контролем служили препараты без инкубации с первичными антителами при полном соблюдении остальных этапов протокола.

Морфометрия. Препараты изучали и фотографировали с помощью микроскопа AxioScope (ZEISS, Германия), оборудованного цифровой камерой AxioCam506 color (ZEISS, Германия). Относительную площадь, занимаемую цитокератиновыми и виментиновыми филаментами, обсчитывали с помощью программ ZEN 2012 (ZEISS, Германия) и Image-Pro Plus.

Статистика. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программы Statistica 6.0 (StatSoft, США). Рассчитывались параметры среднего арифметического значения (M) и стандартного отклонения (SD). Сравнения между группами проводили с помощью непараметрического анализа с использованием U критерия Манна – Уитни. Различия считали значимыми при $P \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Иммунолокализация виментина в эмбриональном и постнатальном периодах развития печени. Виментиновые промежуточные филаменты поддерживают целостность клеток и участвуют в миграции, подвижности и адгезии клеток [7]. Помимо этого, приобретение виментина является характерным признаком эпителиально-мезенхимального перехода [8].

Иммуногистохимическое исследование ткани печени взрослых крыс показало, что характерная положительная реакция на виментин регистрировалась в перисинусоидальных клетках и клетках Купфера, стенках желчных канальцев, а также

в эпителиальных клетках желчных протоков и эндотелиоцитах сосудов (рис. 1Д).

В ткани печени 10-суточных зародышей помимо отложений виментина в эндотелиоцитах и холангиоцитах обнаружили иммунопозитивные недифференцированные мезенхимальные клетки печени и единичные клетки с фенотипом гепатобластов, содержащих гранулы виментина. Наличие гранул виментина в гепатобласте может говорить о происхождении этих клеток путем МЭП [8] (рис. 1А). Относительная площадь виментина на препаратах печени 10-суточных зародышей крыс была значимо ($p < 0,01$) выше, чем на препаратах печени взрослых животных, вероятно из-за гепатобластического типа кроветворения у зародышей (рис. 3).

В ткани печени 17-суточных зародышей крыс помимо иммунопозитивных депозитов виментина в эндотелиоцитах синусоидов, портальных артериол и венул, центральных вен и в холангиоцитах,

обнаружили малодифференцированные гепатоциты с пылевидными иммунопозитивными включениями виментина в цитоплазме, что может рассматриваться как признак МЭП на завершающей стадии (рис. 1Б). Относительная площадь виментина на препаратах печени 17-суточных зародышей крыс также была достоверно ($p < 0,01$) выше, чем на препаратах печени взрослых животных (рис. 3).

У суточных крысят виментин обнаруживали в эндотелиоцитах сосудов, перисинусоидальных клетках, гепатобластах и гепатоцитах (рис. 1В). У 14-суточных крысят устанавливается характерное для взрослых животных распределение виментина в ткани печени: все реже недеференцированные мезенхимальные клетки и виментин-позитивные гепатоциты (рис. 1Г). При этом относительная площадь виментина на препаратах печени суточных и 14-суточных крысят не отличалась достоверно от относительной площади на препаратах печени взрослых животных (рис. 3).

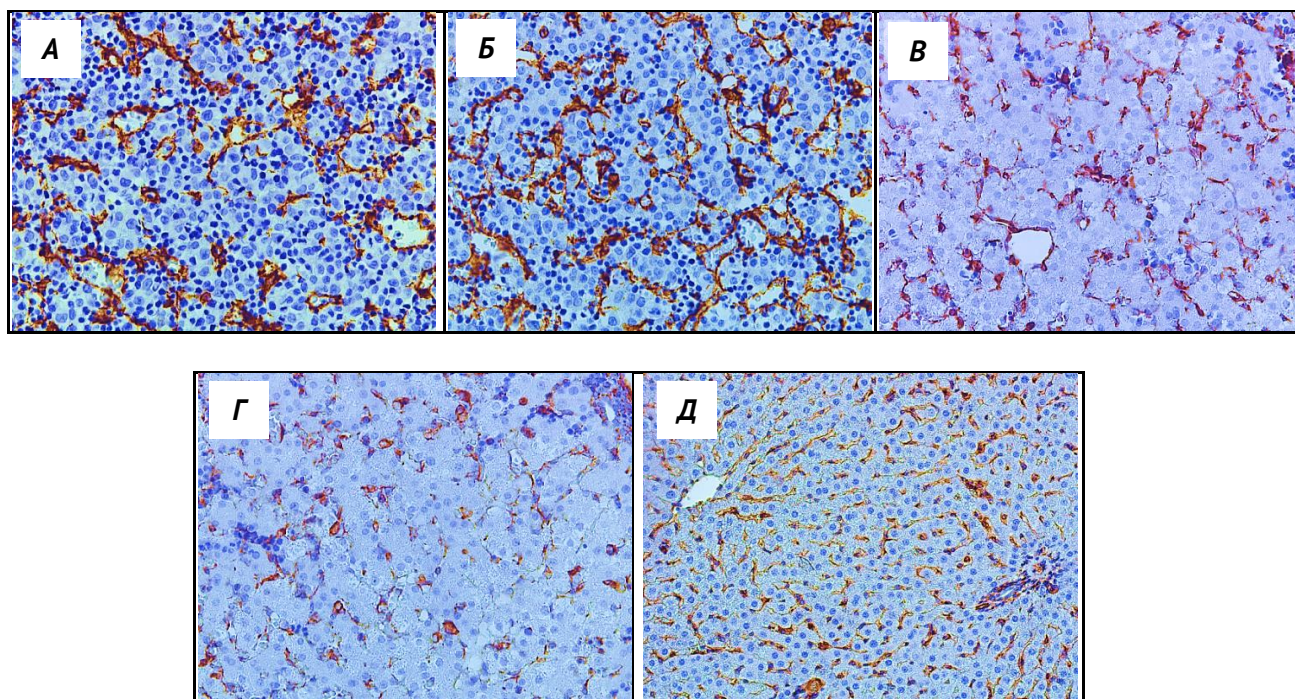


Рис. 1. Динамика распределения виментина в ткани печени крыс:
А – 10-суточного зародыша крысы; Б – 17-суточного зародыша крысы; В – суточной крысы;
Г – 14-суточной крысы; Д – взрослой крысы. Иммуногистохимическая реакция с антителами к виментину.
Докраска ядер гематоксилином Майера. Ув. $\times 200$

Иммунолокализация цитокератина 18 в эмбриональном и постнатальном периодах развития печени

Цитокератин 18 (ЦК18) – это основной эпителиально-специфический промежуточный филамент печени, который синтезируют зрелые гепатоциты и холангиоциты [10]. Также в нормальной ткани печени взрослых животных ЦК18 определяли в эндотелиоцитах

кровеносных сосудов, цитоплазматических мембранах и цитоплазме гепатоцитов. Отмечали яркоокрашенные малодифференцированные гепатоциты в области портальных триад (рис. 2Д).

В ткани печени 10-суточных зародышей крыс обнаружили клетки неправильной формы с фенотипом гепатобластов и крупными иммунопозитивными

гранулами по всей цитоплазме и в околочелювном положении (рис. 2А). Наличие крупных гранул ЦК18 в цитоплазме гепатоцитов не является типичным расположением данного белка в ткани печени взрослых крыс. Относительная площадь ЦК18 на препаратах печени 10-суточных зародышей крыс была статистически достоверно ниже ($p < 0,01$), чем на препаратах печени взрослых животных, вероятно из-за большого количества бластных мезенхимальных клеток (рис. 3).

К 17-м суткам эмбрионального развития расположение ЦК18 у части клеток появляются свойства гепатоцитам иммуногистохимические признаки, что указывает на неравномерную скорость созревания клеток (рис. 2Б). Относительная площадь ЦК18 на препаратах печени 17-суточных зародышей крыс была достоверно ниже ($p < 0,01$), чем на препаратах

печени взрослых животных, и при этом она была также статистически достоверно выше ($p < 0,01$), как на препаратах печени 10-суточных зародышей (рис. 3). Наблюдаемые изменения относительной площади являются следствием увеличения эпителиальных клеток не только в размере, но и в их количестве по отношению к мезенхимальным клеткам.

В клетках печени суточных и 14-суточных крыс определили характерное для зрелых гепатоцитов распределение ЦК18 – в виде преимущественно мембранной формы (рис. 2В, Г). При этом относительная площадь виментина на препаратах печени суточных и 14-суточных крыс была достоверно ниже, чем на препаратах печени взрослых крыс, что может объясняться сохранением недифференцированных клеток и разной плотностью распределения гепатоцитов в тканях печени крысят и взрослых особей (рис. 3).

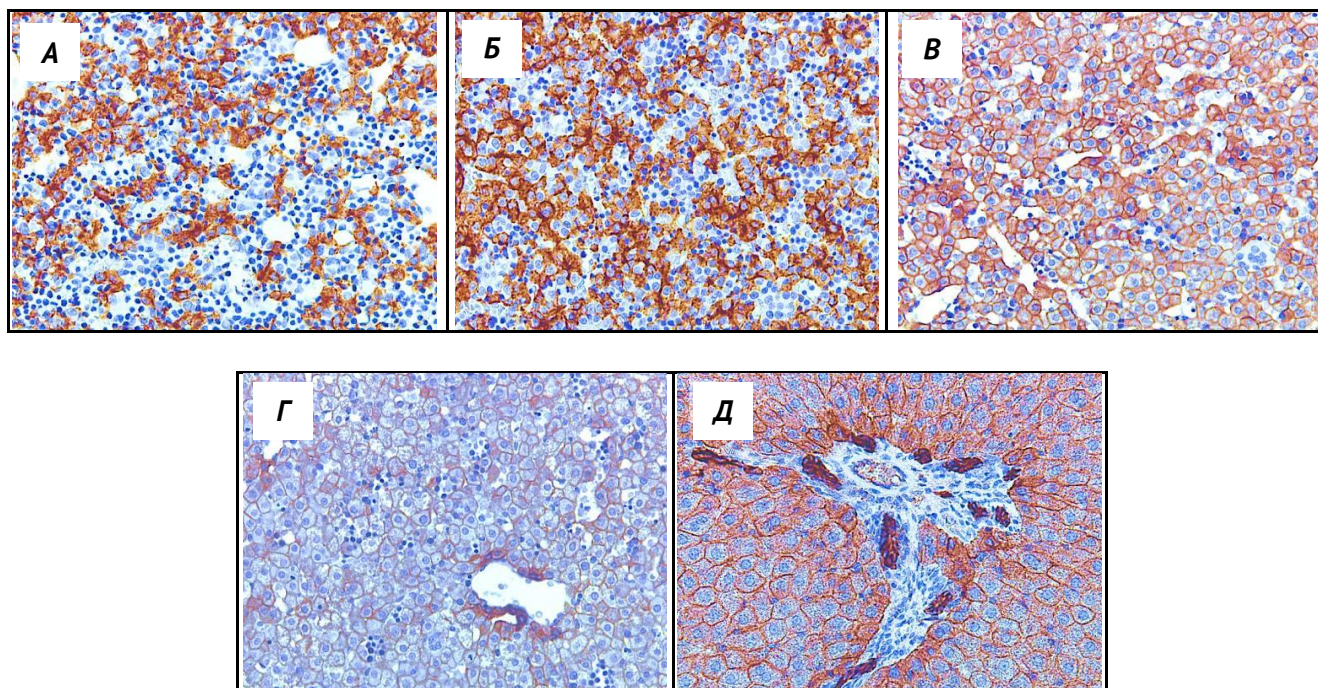


Рис. 2. Динамика распределения цитокератина 18 в ткани печени крыс:

А – 10-суточного зародыша крысы; Б – 17-суточного зародыша крысы; В – суточной крысы;
Г – 14-суточной крысы; Д – взрослой крысы. Иммуногистохимическая реакция с антителами к цитокератину 18.
Докраска гематоксилином Майера. Ув. $\times 200$

Динамика соотношения виментина и цитокератина 18 на различных этапах онтогенеза как доказательство мезенхимально-эпителиального и эпителиально-мезенхимального переходов в ткани печени

Провели количественный анализ динамических изменений относительной площади виментин-позитивных и цитокератин-позитивных клеток, для дополнительной характеристики МЭП при гепатогенезе (рис. 3). Обращало на себя внимание снижение

относительной площади виментина с 13 % на 10-й день эмбрионального развития к 4,47 % на момент рождения, что происходило на фоне снижения кроветворной функции печени, к 14-му дню после рождения относительная площадь виментина незначительно повышалась до 6,13 % и затем снижалась у взрослых особей до 5,66 %. Напротив, частота эпителиальных цитокератин-позитивных клеток повысилась с 17,7% относительной площади на 10-й день эмбрионального

развития до 23,8 % на момент рождения, затем незначительно понизилась до 22,4 % на 17-й день после рождения и окончательно возросла до 33,7 % у взрослых особей (рис. 3, гистограмма).

Снижение отношения виментин/цитокератин 18 (рис. 3, динамическая кривая) от 10-го дня эмбрионального развития до рождения свидетельствовало о повышенной экспрессии эпителиальных генов относительно мезенхимальных, на что указывало превалирование ЦК18 над виментином, подтверждая таким образом МЭП в процессе эмбрионального развития

печени [1]. В ткани печени на 17-й день после рождения отмечали увеличение содержания мезенхимальных белков относительно эпителиальных, что могло быть следствием образования мезенхимальных клеток печени из недифференцированного мезенхимального ростка и/или гепатобластов путем ЭМП (рис. 3, динамическая кривая). В то же время в ткани печени у взрослых особей отмечали снижение отношения виментин/цитокератин 18, вероятно, вследствие пролиферации клеток эпителиального ростка (в первую очередь гепатоцитов).

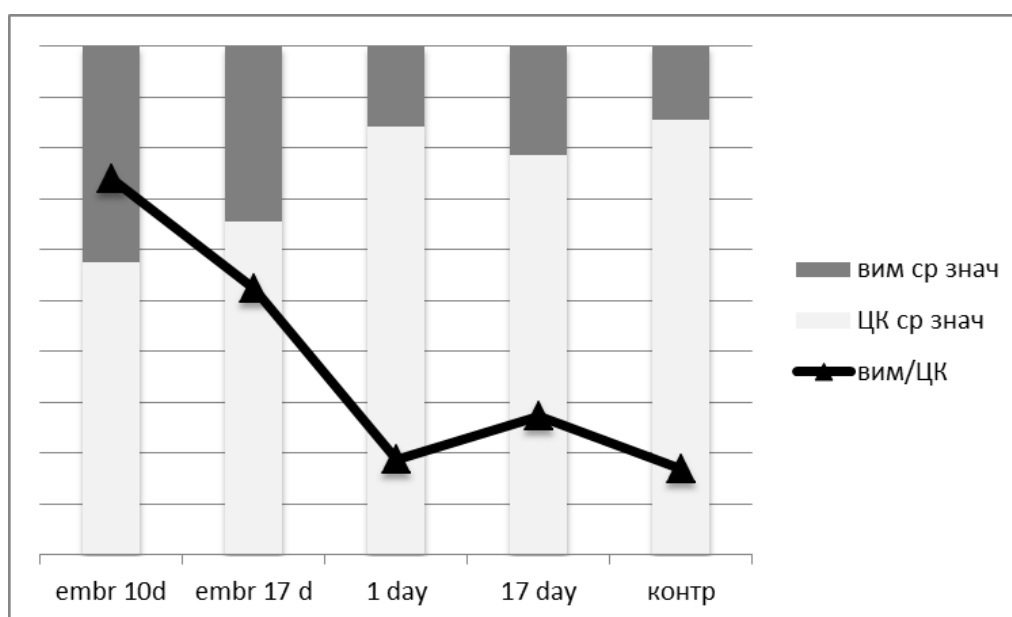


Рис. 3. Динамика соотношения относительной площади виментина и цитокератина на этапах онтогенеза

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, выявлены иммуногистохимические признаки мезенхимально-эпителиального и эпителиально-мезенхимального переходов в эмбриональном и постнатальном морфогенезе печени. Мезенхимально-эпителиальный переход является одним из возможных путей образования эпителиальных клеток печени на первых этапах эмбриогенеза. Эпителиальный росток клеток проявляет признаки зрелости уже к первым суткам после рождения, тогда как мезенхимальный росток созревает позднее.

К 14-му дню после рождения возрастает число мезенхимальных клеток печени, что может говорить о происхождении части мезенхимальных клеток путем эпителиально-мезенхимального перехода. На основании полученных данных можно сделать вывод, что в морфогенезе печени мезенхимально-эпителиальный переход после рождения сменяется эпителиально-мезенхимальным переходом.

REFERENCES

- Gordillo M., Evans T., Gouon-Evans V. Orchestrating liver development. *Development*. 2015;142(12):2094–2108.
- Blouin A., Bolender R.P., Weibel E.R. Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. *J Cell Biol*. 1977;72:441–455.
- Kmiec Z. Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 2001;16:III–XIII,1–151.
- Pei D., Shu X., Gassama-Diagne A., Thiery J.P. Mesenchymal-epithelial transition in development and reprogramming. *Nat Cell Biol*. 2019;21(1):44–53.
- Nieto M.A., Huang R.Y., Jackson R.A., Thiery J.P. EMT: 2016. *Cell*. 2016;166:21–45.
- Kim H.Y., Jackson T.R., Davidson L. On the role of mechanics in driving mesenchymal-to-epithelial transitions. *Seminars in cell & developmental biology*. 2017;67:113–122.
- Ivaska J. et al. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. *Exp Cell Res*. 2007; 313(10):2050–2062.

8. Wangmo C., Charoen N., Jantharapattana K., Decha-phunkul A., Thongsuksai P. Epithelial-Mesenchymal Transition Predicts Survival in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Pathol Oncol Res.* 2020 Jul;26(3):1511–1518.

9. Mansuroglu T., Dudás J., Elmaouhoub A., Joza T.Z., Ramadori G. Hepatoblast and mesenchymal cell-specific

gene-expression in fetal rat liver and in cultured fetal rat liver cells. *Histochemistry and Cell Biology.* 2009; 132(1):11–19.

10. Ku N.O., Strnad P., Bantel H., Omary M.B. Keratins: Biomarkers and modulators of apoptotic and necrotic cell death in the liver. *Hepatology.* 2016;64(3):966–976.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Информация об авторах

Ирина Александровна Дворяшина – аспирант кафедры гистологии, эмбриологии, цитологии, Волгоградский государственный медицинский университет; Волгоград, Россия;

Юлия Ивановна Великородная – аспирант кафедры фармакологии и фармации, Институт непрерывного медицинского и фармацевтического образования, Волгоградский государственный медицинский университет, научный сотрудник лаборатории патоморфологии, Волгоградский медицинский научный центр, Волгоград, Россия, alta-u@mail.ru

Андрей Владимирович Терентьев – аспирант кафедры гистологии, эмбриологии, цитологии Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия, kocha.2009@yandex.ru

Валерий Леонидович Загребин – кандидат медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой гистологии, эмбриологии, цитологии, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия, vlzagrebin@volgmed.ru

Статья поступила в редакцию 30.10.2021; одобрена после рецензирования 23.11.2021; принята к публикации 24.11.2021.

The authors declare no conflicts of interests.

Information about the authors

Irina A. Dvoryashina – Postgraduate Student of the Department of Histology, Embryology, Cytology, Volgograd State Medical University; Volgograd, Russia;

Yulia I. Velikorodnaya – Postgraduate Student of the Department of Pharmacology and Pharmacy, Institute of Continuing Medical and Pharmaceutical Education, Volgograd State Medical University, Researcher at the Laboratory of Pathomorphology, Volgograd Medical Research Center, Volgograd, Russia, alta-u@mail.ru

Andrey V. Terentyev – Postgraduate Student of the Department of Histology, Embryology, Cytology Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia, kocha.2009@yandex.ru

Valery L. Zagrebin – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Head of the Department of Histology, Embryology, Cytology, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia, vlzagrebin@volgmed.ru

The article was submitted 30.10.2021; approved after reviewing 23.11.2021; accepted for publication 24.11.2021.