

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
Լ.Ա. ՕՐԲԵԼՈՒ ԱՆՎԱՆ ՖԻԶԻՈԼՈԳԻԱՅԻ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ

ՄԱՐԻՆԱ ՌԱԶՄԻԿԻ ԹԱԹՈՅԱՆ

**ԵՐԻԹՐՈՊՈՆԵԶԻ ՖԻԶԻՈԼՈԳԻԱԿԱՆ ՓՈՓՈԽՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ
ԽՈՋԵՐԻ ՕՆՏՈԳԵՆԵԶՈՒՄ**

Գ.00.09 – «Մարդու և կենդանիների ֆիզիոլոգիա»
մասնագիտությամբ կենսաբանական գիտությունների դոկտորի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ – 2017

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ им. акад. Л. А. ОРБЕЛИ

ТАТОЯН МАРИНА РАЗМИКОВНА

**ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭРИТРОПОЭЗА
В ОНТОГЕНЕЗЕ СВИНЕЙ**

АВТОРЕФЕРАТ

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

ЕРЕВАН – 2017

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ Լ.Ա. Օրբելու անվան ֆիզիոլոգիայի ինստիտուտի գիտական խորհրդի նիստում 2015թ.-ին

Գիտական խորհրդատու՝ գիտ. վաստակավոր գործիչ, բ.գ.դ., պրոֆ. Ա.Վ. Ազնաուրյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ Կ.գ.դ., պրոֆ. Զ.Ս. Սարգսյան
բ.գ.դ., պրոֆ. Ս.Ս. Դաղբաշյան
բ.գ.դ. Ա.Լ. Մինասյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտ

Պաշտպանությունը կկայանա 2017թ. սեպտեմբերի 14-ին, ժ. 14⁰⁰-ին ՀՀ ԳԱԱ Լ.Ա. Օրբելու անվան ֆիզիոլոգիայի ինստիտուտի 023 մասնագիտական խորհրդի նիստում (375028, Երևան, Օրբելի եղբ. փ., 22):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ Լ.Ա. Օրբելու անվան ֆիզիոլոգիայի ինստիտուտի գրադարանում և [www.info@physiol.sci.am](mailto:info@physiol.sci.am) կայքում: Սեղմագիրն առաքված է 2017 թ. օգոստոսի 14-ին:

Մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար՝ կենսաբանական գիտությունների թեկնածու  Ն.Է. Թադևոսյան

Тема диссертации утверждена на заседании Ученого Совета Института Физиологии НАН РА им акад. Л.А. Орбели в 2015 г.

Научный консультант: засл. деятель науки, д.м.н., проф. А.В. Азнаурян

Официальные оппоненты: д.б.н., проф. Дж.С. Саркисян
д.м.н., проф. С.С. Дагбашян
д.м.н. А.Л. Минасян

Ведущая организация: Институт молекулярной биологии НАН РА

Защита состоится 14 сентября 2017г. в 14⁰⁰ на заседании специализированного совета “023- Физиология” при Институте Физиологии НАН РА им акад. Л.А. Орбели (РА, 0028, ул. Бр. Орбели 22).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института Физиологии им акад. Л.А. Орбели НАН РА и на сайте [www.info@physiol.sci.am](mailto:info@physiol.sci.am)

Автореферат разослан «14» августа, 2017г.

Ученый секретарь специализированного совета
кандидат биологических наук



Н.Э. Татевосян

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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. Кровь во взрослом организме – одна из важнейших интегрирующих систем. В процессе эмбриогенеза она является носителем факторов, регулирующих процессы роста и дифференцировки органов и тканей [Куприкова И.М., и соав., 2012]. 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.

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].

В организме человека ежедневно продуцируется и одновременно погибает 500 млрд клеток крови. Это ставит систему гемопоэза 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 гемопоэтических стволовых клеток [Семенова Н.Ю. и соав., 2014].

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 у птиц, рыб эритроциты еще содержат ядра, то созревание клеток красного ряда у млекопитающих проходит через стадии ядросодержащих эритрокариоцитов в костном мозге, а в кровь поступают безъядерные зрелые эритроциты.

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].

По аналогии с гемопозитическими стволовыми клетками предполагалось, что во главе мезенхимальной иерархии стоит мезенхимальная стволовая клетка 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 [Иванюк Д.И. и соавт., 2011; Шахпазян Н.К. и соавт., 2012; Климович В.Б. и соавт., 2014]. 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 гемопозитических, так и мезенхимальных [Запужалов И.В. и соавт., 2009; Калинина Н.И. и соавт., 2011]. Однако предположение о том, что восстановление соединительных тканей всего организма определяется активностью мезенхимальными стволовыми клетками костного мозга, не получило твердых доказательств до сих пор. Мезенхимальные стволовые клетки способствуют росту гемопозитических предшественников путем секреции ряда цитокинов, макрофагального колониестимулирующего фактора (М-КСФ), гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ), фактора роста стволовых клеток и др. [Кругляков П.В. и соавт., 2006; Латюшин Я.В. и соавт., 2009].

Следует отметить, что результаты большинства экспериментальных исследований гемопоза на моделях животных были перенесены на гемопоз человека [Paulson R.F et al., 2011]. Тем не менее существуют некоторые различия в регуляции гемопоза у человека и грызунов, особенно анатомическое расположение гемопоза в течение жизни. У человека селезенка не обеспечивает эритропоз после рождения, хотя экстрамедуллярный селезеночный эритропоз может возникать в период гемопозитического стресса. В отличие от человека, селезенка грызунов гемопозитически активна на всем протяжении жизни, более того, во всех костях грызунов происходит гемопоз и длинные кости (особенно бедренная и большеберцовая) являются главными местами изучения гемопоза. В противоположность этому гемопоз в длинных трубчатых костях человека, за исключением их проксимальных отделов, прекращается в возрасте 5–7 лет, а красный костный мозг замещается на гемопозитически неактивную жировую ткань [Семенова Н.Ю., 2014].

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

При несостоятельности гемопозза, 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 литературе нам не встретились исследования, в которых было бы приведено комплексное исследование 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.

Впервые 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. Выявлено совместное функционирование двух центров эритропоэза (желточный мешок и печень) на 25 сутки внутриутробного развития свиней. Впервые выявлена экстружия ядер эритробластов на ранних стадиях эритропоэза 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.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Уточнена периодизация и локализация эритропоэза 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 Ереванского государственного медицинского университета им. М. Гераци в материалах лекции, на практических занятиях студентов, а также ординаторами постдипломного обучения.

Научно-практическая значимость работы

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 корригирующие факторы при врожденных анемиях.

Апробация диссертации

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. акад. Л.А. Орбели (2016, 2017); Ассоциации морфологов РА, 2017; на диссертационном 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 216 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, 5 глав, содержащих результаты собственных исследований, заключения, выводов, списка литературы, включающего 275 источников литературы. Работа иллюстрирована 23 таблицами, 24 графиками и 47 рисунками.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В опыте использовались 36 свиноматок породы Ландрас, которые покрывались по достижении ими веса в 130-140 кг в возрасте 11-12 месяцев. После чего начались забор 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 забои следовали на 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75 и 90 день супоросности. Каждый раз забивалось не менее, чем по 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.

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 микронов.

Морфологический анализ эритроидных клеток периферической крови, желточного мешка, печени, селезенки и костного мозга на различных этапах онтогенеза свиней проводили на препаратах, окрашенных азур-эозином по Гимза, гематоксилином по Вейгерту и по Карачи с докраской эозином, азаном по Гейденгайну, а также азаном по Маллори. Изготовление биоптатов, отпечатков и мазков проводилось рутинным методом (Ромейс Б., 1953).

Окраска ДНК по Фельгену и цитофотометрия ДНК

Для цитохимических исследований зафиксированные на предметном стекле препараты окрашивали реактивом Шиффа по Фельгену. Гидролиз ДНК проводили в 5N HCl в течение 1 часа при 22°C (Магакян, Каралова, 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), созданным 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 пloidности. 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 стан-

дарта (лимфоидные клетки) демонстрируют нормальное распределение вариационного ряда с соответствующей кривой.

Окраска белка нафтоловым желтым и цитоспектрофотометрия суммарного белка

Для вычисления общего белка в заранее приготовленные препараты были окрашены нафтоловым желтым. Техника окраски проводилась рутинным методом (Gaub 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 «Image J».

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) - по Deich R.B (1966), после чего раствор фильтровали переливали в сосуд объемом 100 мл и с помощью HCl или NaOH устанавливали pH раствора красителя 1.64. Для окрашивания использовались свежеприготовленные растворы красителя. Окрашивание производилось в течение 48 часов, затем препараты промывали в течение 30 мин водопроводной водой. Для обезвоживания использовались 70%, 95% и абсолютный спирты, каждый в течение 5 мин. Окрашивание всех препаратов проводилось одновременно. Измерение оптической плотности РНК проводились на длине волны 620 нм на цитоспектрофотометре SMP 05 Opton. Для цитометрического анализа размеров клеток использовалась компьютерная программа «Image J».

Цитоспектрофотометрия неокрашенного гемоглобина в различных эритроидных клетках

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 эмбрионов свиней и на неокрашенных мазках периферической крови, на ультрафиолетовой длине волны (414нм). Данный показатель необходимо анализировать вместе гистограммой распределения содержания гемоглобина в эритроцитах.

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

Морфометрический анализ измерения и подсчет морфологических параметров на срезах препаратов кроветворных тканей эмбриональной печени, селезенки и костного мозга определялся с использованием стандартной компьютерной программы открытого доступа «Image J». В каждом случае использовалось не менее 4 срезов органов, а в каждом срезе рассматривалось не менее 30 полей зрения на малом увеличении 0.4 мм². Поля зрения выбирались случайным путем, исключая капсулу органов.

Исследование цитокинов в сыворотке периферической крови

Изучение сывороточных уровней материнских колониестимулирующих факторов (КСФ) проводилось с помощью иммуноферментного анализа (ELISA). 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.

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

Определение колониестимулирующих факторов и эритропоэтина проводилось в сыворотке периферической крови четырех здоровых свиноматок до беременности (исходная группа) и в процессе беременности. Около 4мл крови брали из глазной вены всех участвующих в опыте свиноматок. Отделение сыворотки для иммуноферментного анализа реакции осуществлялось путем осаждения форменных элементов крови. До проведения иммуноферментной реакции сыворотки хранили при температуре 85⁰С как контрольных, так и беременных животных. Максимальный срок хранения сывороток 60 дней.

Статистическая обработка

Все полученные экспериментальные данные были обработаны методами вариационной статистики с использованием пакета прикладных программ для статистической обработки Microsoft Excel 2010. В каждой группе для всех признаков вычисляли среднее арифметическое, стандартное отклонение и среднюю ошибку среднего арифметического. Достоверность различий определяли по t-критерию Стьюдента, при непараметрическом распределении признаков использовался U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни. Корреляционный анализ проводился по Пирсону с помощью программы SPSS 17.0 (SPSS, INC., Chicago, IL) с оценкой коэффициента корреляции-г.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Периодизация эмбрионального развития свиней.

Проанализировав литературные данные и основываясь на собственные, мы разделили эмбриональный 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.
3. Фаза первичной дифференциации зародыша. Длится с начала 10-х до 15-х суток зародышевого развития. Характеризуется тем, что за этот сравнительно короткий

период 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. 1).

4. Фаза вторичной дифференциации зародыша или органогенез. Распространяется на отрезок зародышевого развития примерно с 15-х до 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. 2).
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 начинается дифференциация центральной и периферической нервной системы. Этой фазой завершается зародышевый период развития свиньи, после чего мы имеем дело уже со сформированным плодом.

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, терморегуляции, функциональной деятельности органов чувств и эндокринных органов.

Собственные 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. 3).

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 функций нервной и других систем органов, в результате чего формируется жизнеспособный, в значительной степени приспособленный к самостоятельному образу жизни и функционально независимый к моменту рождения, организм.

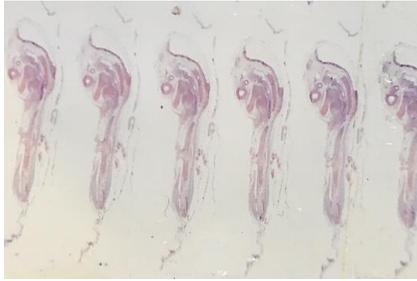


Рисунок 1. Сагитальный срез эмбриона свиньи на 15 сутки внутриутробного развития. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение 15х.

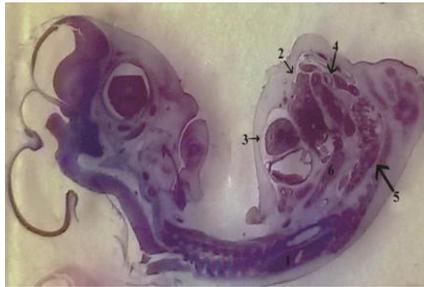


Рисунок 2. Внутренние органы на сагитальном разрезе эмбриона свиньи на 25 сутки внутриутробного развития. 1- позвоночник, 2- печень, 3 - сердце, 4 - петля средней кишки /hernia umbilicalis/, 5- первичная почка, 6 - легкое. Окраска азаном по Маллори Окуляр 10х, объектив 4х.

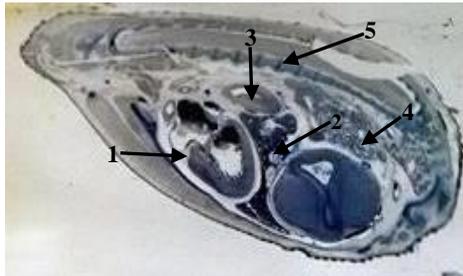


Рисунок 3. Сагитальный срез абдоминальной части плода свиньи на 45 сутки внутриутробного развития. Окраска азаном по Гейденгайну. Окуляр 10х, объектив 4 х. 1 - сердце, 2- печень, 3- легкое, 4- вторичная почка, 5- позвоночник.

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, их усложнения, а также усложнения биохимических и физиологических процессов. Предложенная выше система периодизации внутриутробного развития свиньи не является полноценной,

проведена нами в связи с исследованиями всех кроветворных органов, которые мы провели при изучении эритропоэза на всех этапах эмбрионального развития свиньи.

Мезенхимальный эритропоэз в эмбриогенезе свиньи.

С точки зрения морфологического анализа, гистологии и цитологии клеток эмбрионального гемопоэза у свиней мы сочли удобным разделить его на следующие отделы: это интраэмбриональная самая ранняя зона локализации гемопоэтических клеток, которая включает парааортальную мезенхиму и AGM-область (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 15-20 дня гестации, к нему уже присоединяется экстраэмбриональное кроветворение в желточном мешке и вплоть до 30 дня оно 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.

Исследования показали, что у 15-и суточного зародыша свиней, в мезенхиме перикардиальной области видны вкрапления эритроидных клеток, которые образуют так называемые кровяные островки. Надо заметить, что у свиней кроветворение в эмбриональной мезенхиме полости тела напоминает кровяные островки желточного мешка, только меньшего размера, и соответственно содержат меньшее число клеток. Эти очаги эритропоэза хорошо заметны у 15 и 25 дневного эмбриона свиньи, однако практически полностью исчезают у 35 дневного зародыша свиньи.

В структуре мезенхимального кровяного островка эмбриона свиньи, хорошо видны эритроидные клетки крови, которые принято называть гемангиобластами. 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 (рис. 4).

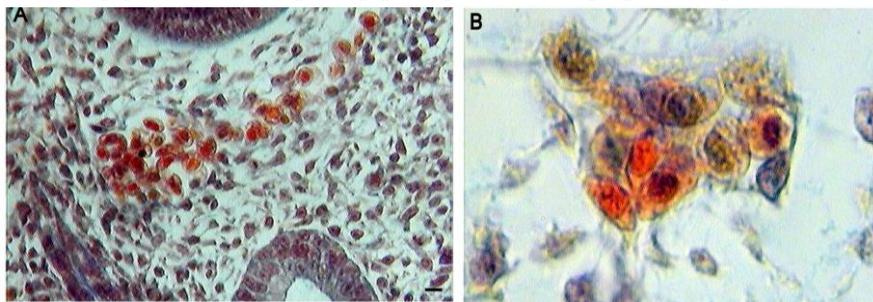


Рисунок 4. Первичный примитивный эритропоэз в перикардиальной области 15 суточного эмбриона свиньи. Окраска гематоксилин-эозином по Карачи (А) и азаном по Гейденгайну (В). Масштаб 10 μ m

Популяционный состав представлен следующим образом, подавляющее число (около 63%) составляют гемангиобласты, и 37% приходится на первичные эритроциты (табл.1). 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, важно заметить, что площадь ядер мелких и крупных эритробластов, а также примитивных эритроцитов незначительно отличается 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 эритробластиками и эритроцитами незначительна.

Таблица 1.

Популяционный анализ изменения площади ядер, цитоплазмы и ядерно-цитоплазмальных отношений эритроидных клеток зародышей свиньи (μm^2) на 15-е сутки внутриутробного развития ($M \pm SD$)

Типы клеток	%	Клетки	Ядро	Цитоплазма	Ядерно-цитопл. отношения
Мелкие бласты	5.0	54.6 \pm 2.4	18.0 \pm 4.0	36.6 \pm 1.9	0.5
Крупные бласты	58.0	83.3 \pm 5.2	22.9 \pm 4.1	60.4 \pm 3.2*	0.4
Усредн.показатель	63.0	80.8 \pm 15.8	22.5 \pm 4.1	58.3 \pm 13.5	0.4
Мелкие эритроциты	9.0	54.1 \pm 4.3	15.2 \pm 2.6	38.9 \pm 2.7	0.4
Крупные эритроциты	28.0	86.1 \pm 8.1	23.2 \pm 4.0	62.9 \pm 6.7*	0.4
Усредн.показатель	37.0	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*

Данные, полученные нами по динамике изменения содержания гемоглобина в мезенхимальных эритроидных клетках выявили, что наибольшее содержание гемоглобина проходит 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. 2).

Таблица 2.

Содержание гемоглобина (Hb, пк/г) в мезенхимальных эритробластиках и эритроцитах эмбрионов свиньи на 15-е сутки беременности ($M \pm SD$)

Типы клеток	Бласты		Эритроциты	
	%	Hb	%	Hb
Мелкие	5.0	34.8 \pm 0.9	9.0	34.5 \pm 1.2
Крупные	58.0	53.1 \pm 1.2*	28.0	54.8 \pm 2.3*
Усредн. показатель	63.0	51.5 \pm 1.7	37.0	52.6 \pm 2.3

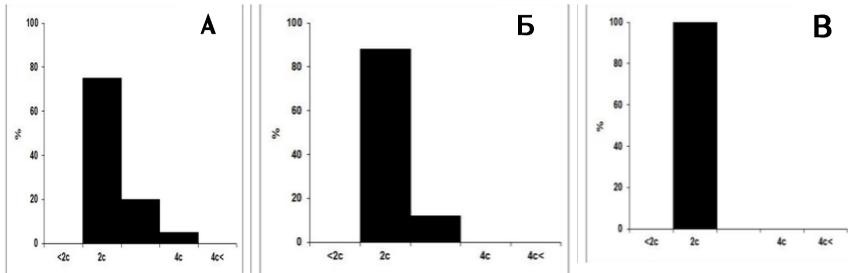
*Примечание: *достоверно ($p < 0,01$) по сравнению с мелкими клетками*

Важно заметить, что при этом подавляющее число составляют крупные эритроидные клетки, в которых количество гемоглобина превосходит количество гемоглобина в мелких их аналогах.

Исследование распределения ядер мезенхимальных эритроидных клеток по классам пloidности (граф. 1) выявило, что основную массу эритроидных клеток на 15-е сутки внутриутробного развития зародышей (около 80%) составляет диплоидная популяция, число гипердиплоидных клеток не превышает 15%, а количество тетраплоидных клеток составляет не более 5% от всей популяции на 15 день развития эмбриона. 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 1.

Распределения ядер мезенхимальных эритроидных клеток по классам плоидности.



А – 15 сутки внутриутробного развития эмбриона; Б - 25 сутки внутриутробного развития эмбриона; В - 35 сутки внутриутробного развития эмбриона.

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 и безъядерные эритроциты, 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. 3).

Таблица 3

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*

Таким образом, в отличие от общепринятого описания формирования островков крови, в которой примитивный эритропоэз возникает внутрисосудисто в желточном мешке, наши данные показывают, что у свиней он начинается экстраваскулярно в парааортальной мезенхиме и AGM-области.

Эмбриональный гемопоэз в желточном мешке

Начиная с 15-20-х суток внутриутробного развития, начинается экстраэмбриональное кроветворение в желточном мешке, где клетки крови образуют так называемые кровяные островки. В примитивных кровяных островках желточного мешка клетки дифференцируются на плоские и округлые клетки. Плоские клетки, располагающиеся по периферии кровяных островков, теряют связь с клетками, располагающимися в центре и превращаются в эндотелиальные клетки (рис. 5). А

округлые клетки, расположенные в центре кровяного островка, превращаются в примитивные клетки крови.

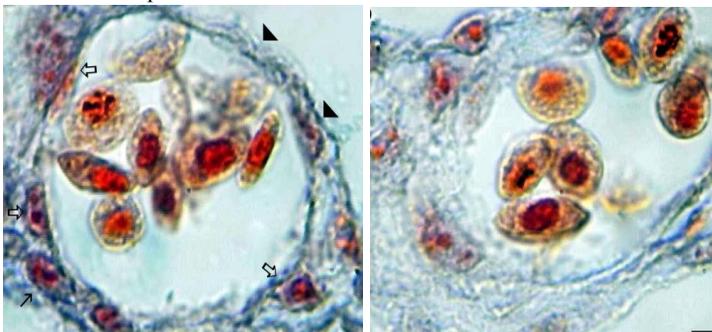
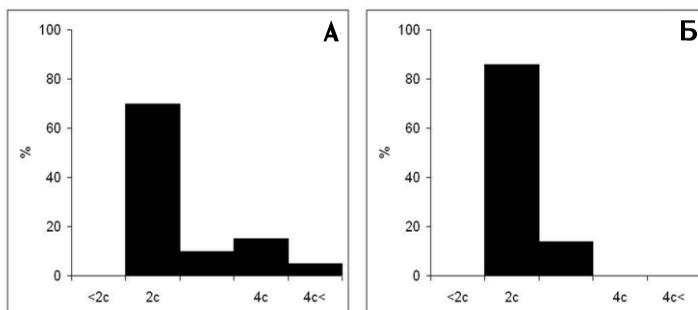


Рисунок 5. Примитивный кровяной островок в желточном мешке, 15-е сутки. Выявляются примитивные эритроидные клетки, окруженные эндотелием (прозрачные стрелки), расположенные между энтодермой (черные стрелки) и мезотелиальными клетками (треугольники). Окраска азаном по Маллори. Масштаб 10 μ m

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

При оценке содержания ДНК в ядрах примитивных эритроидных клеток желточного мешка 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. 2).

График 2.
Распределение примитивных эритроидных клеток по классам плоидности ДНК на 15 и 25 сутки внутриутробного развития эмбриона свиньи.

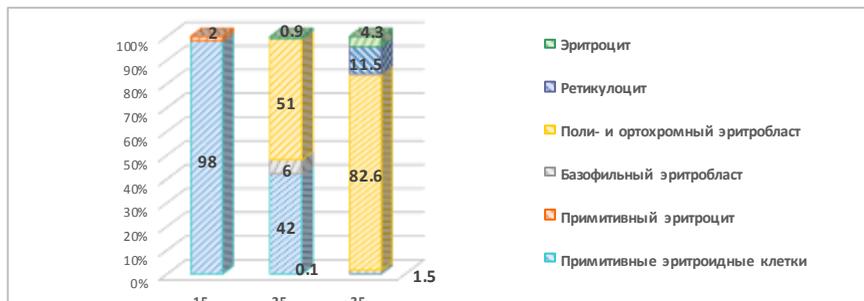


*А - Примитивные эритроидные клетки на 15 сутки;
Б - Примитивные эритроидные клетки на 25 сутки.*

Основная же популяция клеток на 25 сутки эмбрионального развития представлена диплоидными, при этом выявляются также и гипердиплоидные клетки, а тетраплоидные клетки исчезают из общей популяции, что свидетельствует о угасании пролиферативной активности эритроидных клеток.

График 3

Популяционный состав эритроидных клеток в ранний период эмбрионального развития свиньи



По оси абсцисс – возраст эмбрионов (сутки)

По оси ординат – популяционный состав эритроидных клеток %

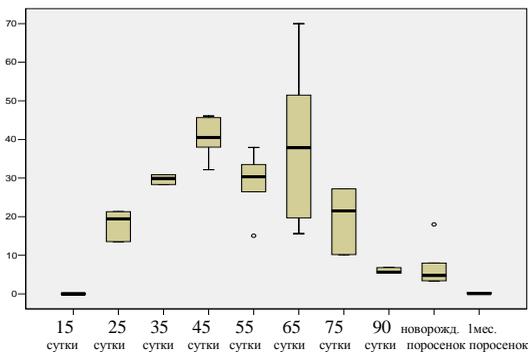
Согласно нашим данным экстраэмбриональное кроветворение в кровяных островках желточного мешка является доминирующим типом кроветворения на 15 сутки внутриутробного развития эмбриона свиньи, на 25 сутки остается значимым (не менее 40%), а на 35 сутки кроветворение в желточном мешке практически исчезает (график 3).

Эмбриональный эритропоэз в печени свиньи

Начиная примерно с 20 суток внутриутробного развития эмбриона, гемопоэз постепенно перемещается в печень, которая со временем становится основным кроветворным органом и является активной в этом отношении (впрочем постепенно снижаясь) до момента рождения.

График 4.

Эритропоэз в печени на протяжении всего периода эмбрионального развития (%)



По оси абсцисс – возраст эмбрионов в сут.

По оси ординат – объем эритропоэза в печени в %

Эритропоэз в печени, начинаясь, примерно, с 25 суток внутриутробного развития эмбриона, достигает максимума у 45-65 дневного плода свиньи, а затем постепенно снижается (график 4). Впрочем, даже у новорожденного поросенка эритропоэз в печени продолжает функционировать и полностью исчезает лишь к первому месяцу постнатального развития свиньи (рис. 6).

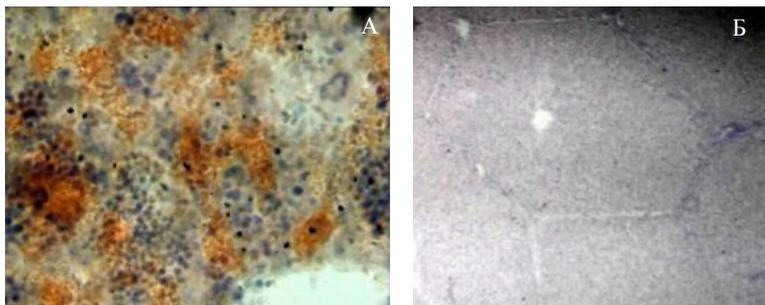
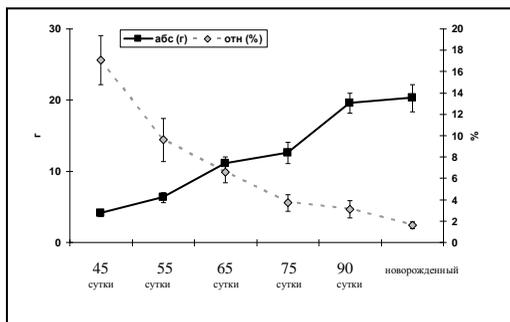


Рисунок 6. Печень 55-дневного плода свиньи, заметны множественные очаги экстраваскулярного эритропоэза (А), а также полное отсутствие эритропоэза у месячных поросят (Б). Окраска гематоксилин-эозином, с докраской суданом III. Окуляр 12.5х, объектив 25х.

Данные взвешиваний печени плодов свиньи на различных сроках эмбрионального развития, говорят о снижении интенсивности роста и относительного веса ее в течение внутриутробного развития (график 5). 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.

График 5

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)

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 и происходит изменение гистоструктуры печени. 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.

Кроветворение в костном мозге

У свиней костный мозг появляется на начальном этапе эмбриогенеза к концу первого месяца развития эмбриона. Костный мозг появляется впервые в плоских костях и позвонках, а затем в трубчатых костях конечностей.

У 25-дневного эмбриона свиньи в хрящевом скелете появляется полость, в которой выявляются остеобласты и ретикулярные клетки. Необходимо отметить, что на данном этапе нами выявлена достаточно интенсивная пролиферация стромальных клеток будущего костного мозга. 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 в диафизах конечностей и хвостовых позвонках красный костный мозг превращается в желтый (жировой).

Начиная с 55-65 дня гестации в строме костного мозга возникают отдельные очаги гемопоэза, но при этом уровень эритропоэза относительно незначительный (в пределах нескольких процентов от общего числа клеток) (рис. 7).

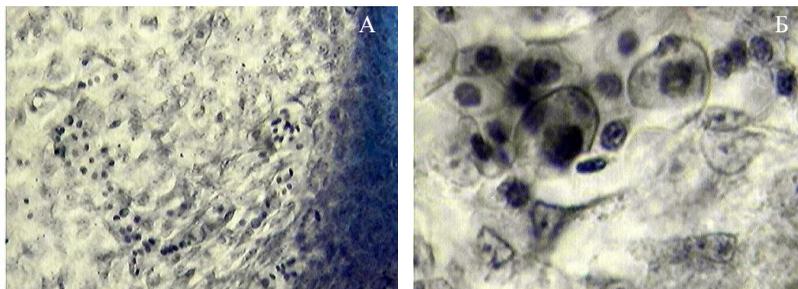


Рисунок 7. Начальный этап развития паренхимы костного мозга позвонка скелета 45 дневного эмбриона свиньи. Окраска азаном по Гейденгайну.
А - Окуляр 12,5х, объектив 25х. Б - Окуляр 12,5х, объектив 100х.

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 у 65-и дневного эмбриона их нет. Тем самым, можно полагать, что несмотря на более позднее развитие эритропоэза в костном мозге, небольшая (статистически невыявляемая) часть клеток переходит в ядерные формы эритроцитов (таблица 4).

Таблица 4.

Популяционный состав клеток костного мозга (%) в онтогенезе свиньи (M±SD)

Клетки	25-сутки	45 ¹ -сутки	65 ¹ -сутки	Новорожденный Поросенок	4-х месячный 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
Прозеритробласты	-	-	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

¹ - на данных сроках исследовались позвонки хрящевое скелета эмбриона

Онтогенез эритробластических островков свиньи.

На начальном этапе (25 дневный эмбрион) печеночного гемопоэза происходит формирование примитивных эритроидных клеток, которые вскоре формируют очаги кроветворения [Ferkowicz, Yoder, 2005; Isern et al, 2011; Tatyoyan M. et al., 2015]. Это кроветворение является мезобластическим, идентичным кроветворению в желточном мешке. На эти сроки эритропоэз в печени происходит в кровяных островках без участия макрофага.

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

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, 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. 8).

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.

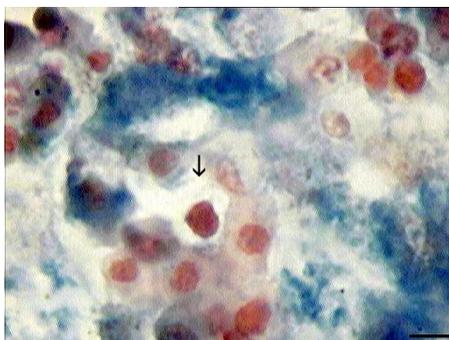


Рисунок 8. Печень 25-дневного эмбриона свиньи. Макрофагоподобная клетка (указана стрелкой) в окружении гемопоэтических клеток. Окраска по Гимза. Масштаб 10µm.

Нами также показана характерная для эритробластических островков экструзия ядра эритробласта с ее последующим фагоцитозом центральным макрофагом островка (рис. 9). Следовательно, появление безъядерных эритробластов на данной стадии является результатом формирования эритробластических островков. Таким образом, в печени последовательно сменяются два типа эритропоэза – примитивный и дефинитивный.

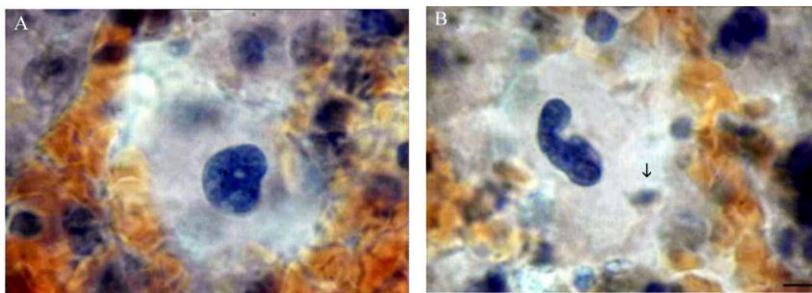


Рисунок 9. Печень 55-дневного плода свиньи. Эритробластический островок (А, В). Заметно фагоцитированное ядро эритробласта (указано стрелкой). Окраска гематоксилин-эозином, с докраской суданом III. Масштаб 10µm.

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 (табл. 5).

Таблица 5.

Цитофотометрические и функциональные показатели эритробластических островков печени и костного мозга свиней ($M \pm SD$)

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

Примечание:

* достоверно в сравнении с печеночными эритробластическими островками ($p < 0.05$)

На рисунке 10 приведен типичный эритробластический островок костного мозга трехмесячного поросенка, где заметна типичная корона эритробластического островка, с содержанием различных ядросодержащих эритроидных клеток.

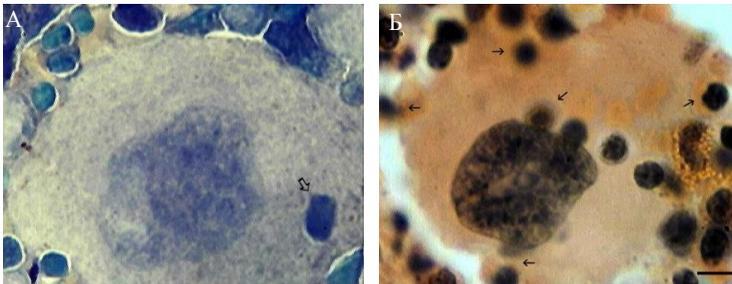
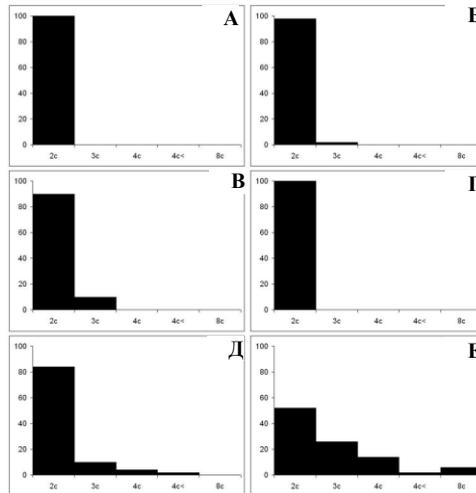


Рисунок 10. Эритробластические островки (ЭО) костного мозга 3-х месячного поросенка. Эритробласты показаны черными стрелками, фагоцитированные ядра - прозрачными стрелками. Отпечатки аспирата (А) Окраска по Гимза. Срез ЭО костного мозга (Б.) Окраска гематоксилин – эозином, с докраской суданом III. Масштаб 10 μm .

Популяция макрофагов печеночных эритробластических островков в основном диплоидная и лишь небольшая часть на 55-65 сутки внутриутробного развития плода гипердиплоидна (граф. б). С учетом данных по вовлечению ткани печени в эритропоэз, 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.

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



А. 45-сутки макрофаги печеночных ЭО, Б. 55-сутки макрофаги печеночных ЭО, В. 65-сутки макрофаги печеночных ЭО, Г. 75-сутки макрофаги печеночных ЭО, Д. макрофаги костного мозга новорожденных поросят, Е. макрофаги костного мозга 3-х месячных 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 содержание ДНК в ядрах центральных макрофагов. Если у новорожденных поросят в эритробластических островках костного мозга более 80% макрофагов диплоидны, то у трехмесячных поросят диплоидны около 50% макрофагов. Вероятно, повышение содержания ДНК в ядрах макрофагов, приводит к увеличению функциональной активности всего эритробластического островка костного мозга, т.е. к повышенной продукции эритробластов.

Здесь возникает одна из важных проблем эмбрионального эритропоэза, а именно определение сроков возникновения эритробластических островков. Наши данные четко указывают на возникновение эритробластических островков в печени на 45 сутки и наличие схожих структур, в незначительном количестве, на 35 сутки внутриутробного развития свиньи.

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 различных локализациях. Долгое время считалось, что первый этап осуществляется в желточном мешке и возникают, в основном, примитивные эритроидные клетки, а также макрофаги и мегакариоциты. Второй этап 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, увеличиваются 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. 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.

Наши исследования показывают, что первые клетки крови впервые появляются в начале гаструляции и имеют интраэмбриональную локализацию. Последняя включает парааортальную мезенхиму 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 35-37 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 кроветворным островкам желточного мешка, в мезенхиме полости тела не формируется [Tatoyan M. et al., 2016].

Следующим органом эритропоэза является желточный мешок, в котором клетки крови образуются вне тела зародыша 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. 11).



Рисунок 11. Примитивные гемопоэтические клетки в кровяном островке желточного мешка на 15-е сутки внутриутробного развития свиньи. Выявляются делящиеся клетки. Окраска азаном по Маллори. Масштаб 10 μm .

Проведенный нами анализ изменения популяционного состава эритроидных клеток на всем протяжении гестации, представленный в таблице 6, 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. 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 6.

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

Типы клеток	Дни гестации						
	15сутки	25 сутки	35 сутки	55 сутки	65 сутки	75 сутки	90 сутки
Мелкие бласты	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 бласты	58.0±6.1	36.0±1.9*	18.0±1.5*	5.9±0.05*	0.6±0.07*	-	-
Усредн.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
Мелкие эритроциты	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 эритроциты	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*
Усредн.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, по сравнению с 15 дневным эмбрионом ($p < 0,05$)

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).

Таблица 7.

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

Клетки (%)	Сроки эмбрионального, плодного и постнатального развития (дни)								Новорожд. поросянок	Месячный поросянок
	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 животных

² отличие полихроматофильных и ортохромных эритробластов на данном этапе затруднительно

³ на 25 сутки внутриутробного развития свиней ретикулоциты и ортохромные эритробласты отличаются лишь по количеству гемоглобина

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).

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. 7).

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. 8).

Таблица 8.

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

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

Примечание:

* достоверно по сравнению с постнатальными эритроцитам - соответственно $p < 0.05$

** тенденция по сравнению с постнатальными эритроцитам ($p < 0.1$).

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

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. 1,9).

Таблица 9.

Популяционный анализ изменения площади ядер, цитоплазмы и ядерно-цитоплазменных отношений эритроидных клеток (μm^2) зародышей свиньи на 25-е и 35-е сутки внутриутробного развития ($M \pm SD$)

Тип клетки	25				35			
	клетка	ядро	цитоплазма	я/ц отношения	клетка	ядро	цитоплазма	я/ц отношения
Мелкие бласты	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 бласты	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	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
Мелкие эритроциты	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 эритроциты	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	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: *достоверно по сравнению с мелкими клетками ($p < 0,05$)*

Важно отметить, что ядерно-плазменные отношения у всех видов эритроидных клеток с возрастом уменьшаются, но при этом у мелких эритробластов и эритроцитов на 25-е сутки они достигают 0,5, а у крупных их аналогов не превышают 0,4. Однако на 35-е сутки ядерно-цитоплазменные отношения эритроидных клеток свиней падают, доходя до 0,3 и держатся на этом уровне до 55 суток гестации (табл. 9). 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. 10). 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. С увеличением возраста эмбриона содержание гемоглобина в клетках имеет не выраженную тенденцию к снижению.

Таблица 10.

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

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. поросенок	Эритроцит	Печень, костный мозг	18.6±0.8
Трехмесячный поросенок	Эритроцит	Костный мозг	18.2±2.1

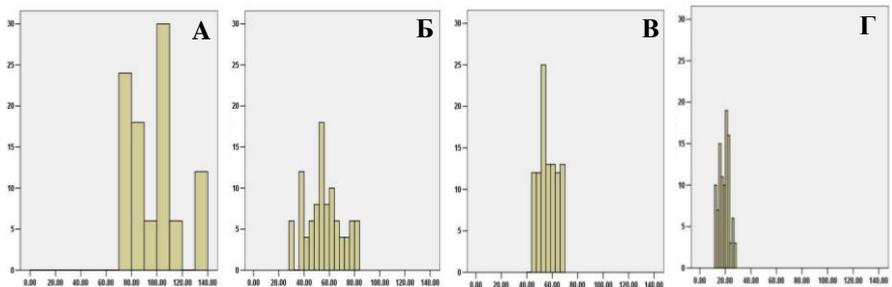
Примечание: * достоверно выше, по сравнению с постнатальными эритроцитам ($p < 0.05$).

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

Как следует из графика 7А, наибольшее содержание гемоглобина приходится на ранние, примитивные эритроидные клетки образующиеся в желточном мешке. Надо заметить, что эта популяция достаточно гетерогенная, в ней выделяются клетки со значительно большим содержанием гемоглобина.

График 7.

Распределение основных эритроидных клеток эмбриона свиньи и зрелых эритроцитов свиньи по содержанию гемоглобина



По оси абсцисс – содержание гемоглобина (Hb, пг).

По оси ординат – частота (%).

А. Примитивная эритроидная клетка; Б. Ранний ядерный эмбриональный эритроцит;

В. Поздний эмбриональный эритроцит; Г. Зрелые эритроциты

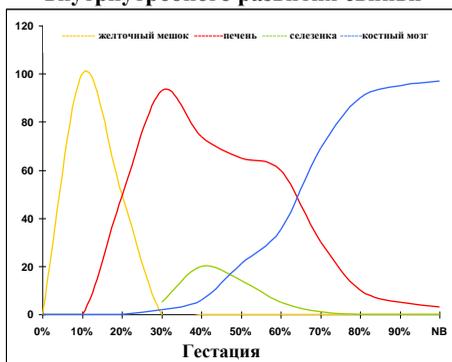
На более поздних сроках онтогенеза такое гетерогенное распределение гемоглобина исчезает, и соответствует нормальному вариационному ряду. Необходимо добавить, что повышенное содержание гемоглобина не приводит к более эффективному транспорту кислорода из-за малого (по сравнению с более поздними сроками)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

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 свињи во время внутриутробного развития (график 8).

При этом выявлено, 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.

График 8.

Временная локализация кроветворных тканей во время внутриутробного развития свињи



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.

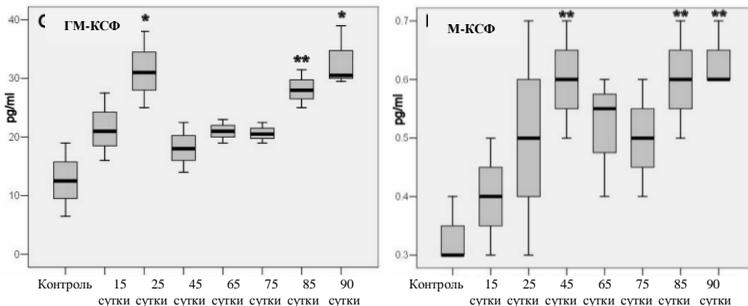
Регуляция эмбрионального эритропоэза свиней материнскими КСФ

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.

При измерении сыровоточных уровней колониестимулирующих факторов в крови свиноматок во время беременности, нами выявлено достоверное повышение уровня гранулоцит-макрофаг колониестимулирующего фактора на 25 и 90 сутки гестации. На 85 сутки отмечена выраженная тенденция к подъему. Уровень макрофаг колониестимулирующего фактора не выявил достоверных изменений в сыровотке свиноматок, однако нами была выявлена выраженная тенденция к росту М-КСФ на 45, 85 и 90 сутки беременности (график 9).

График 9.

Уровни колониестимулирующих факторов в крови беременных свиноматок в динамике беременности.

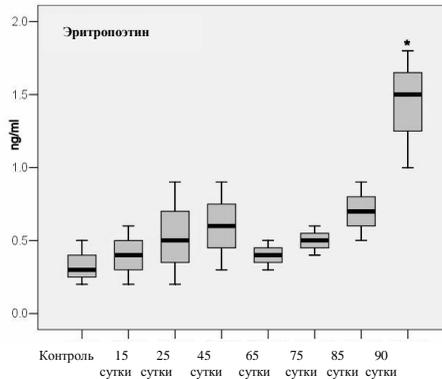


Примечание: * достоверно по сравнению с контролем ($p < 0,05$)
** тенденция по сравнению с контролем ($p < 0,1$)

Таким образом, повышение уровней материнских макрофагальных колониестимулирующих факторов (КСФ) предшествует переходу эритропоэза в желточном мешке к печеночному эритропоэзу, а затем совпадает с переходом эритропоэза в костный мозг зародыша. Полученные данные свидетельствуют об ассоциации материнских макрофагальных КСФ с важнейшими этапами эмбрионального эритропоэза у свиней.

В отличие от уровней КСФ, уровень эритропоэтина оставался практически неизменным, почти до конца гестации, когда на 90-е сутки нами зафиксирован достоверный рост содержания эритропоэтина в сыровотках беременных свиней (граф. 10).

**Уровень эритропоэтина в крови беременных свиноматок
в динамике беременности.**



*Примечание: *достоверно по сравнению с контролем ($p < 0,01$)*

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

Проведенное нами исследование впервые показало, что в эмбриогенезе свиньи вначале формируется интраэмбриональная зона локализации гемопоэтических клеток, которая включает парааортальную мезенхиму и аорто-гонадо-мезонефральную область. В дальнейшем с 15-25 суток гестации наряду с интраэмбриональным происходит экстраэмбриональное желточное кроветворение, когда клетки крови образуются за пределами зародыша в стенке желточного мешка, где формируются очаги кроветворения - кровяные островки.

Полученные нами данные по содержанию гемоглобина в эритроидных клетках желточного мешка, свидетельствуют 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.

Впервые нами показано, что в мегалобластическом эритропоэзе свиней у 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.

Сравнительный анализ временной локализации кроветворных тканей во время внутриутробного развития свиньи показал, что в отличие от человека, у свиньи происходит более раннее участие печени в эритропоэзе, уже начиная с 20 дня гестации. 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.

Возникновение эритробластических островков следует отнести к 35-40 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 эритробластов. 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. Нами также выявлено, что для созревания центральных макрофагов эритробластических островков костного мозга свиней характерно возрастание содержания ДНК в ядрах, вплоть до формирования полиплоидной популяции.

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.

ВЫВОДЫ

1. Выявлено, что весь период мезенхимального эритропоэза у свиней занимает около трех недель - он появляется на 13-15 сутки внутриутробного развития эмбриона, затем на 25 сутки пролиферативная активность гемопоэтических клеток начинает снижаться и практически исчезает на 35-37 сутки развития зародыша свиньи.
2. Выявлены более ранние сроки развития эритропоэза в желточном мешке по сравнению с данными литературы.
3. Основная часть примитивных эритроидных клеток в желточном мешке 15 дневного эмбриона 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 превосходит более чем в два раза площадь эмбриональных 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 материнских колониестимулирующих факторов в пренатальный эритропоэз, стимулирующее действие которых связано не с дифференцировкой эритроидных клеток, а с активацией и дифференцировкой макрофагов, в том числе и центральных макрофагов эритробластических островков.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. **А.В. Азнаурян, Н.Г. Нерсисян, М.Р. Татоян** Эритробластемия при острой форме Африканской чумы свиней // Вопросы теоретической и клинической медицины, Ереван, 2014, 7(96), С. 52-53.
2. **М.Р. Татоян** Развитие легких в разные периоды онтогенеза свиней. // Вопросы теоретической и клинической медицины, Ереван, 2015, 4(100), С. 23-25.
3. **Г.А. Арзуманян, М.Р. Татоян, Д.А. Сароян** Эмбриональное кроветворение в печени свиньи // Кровь. Научно-практический журнал. 1(19) 2015, С. 50-53.
4. **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. [http:// www.porc.bioflux.com.ro/](http://www.porc.bioflux.com.ro/)
5. **Karalova E. Zakaryan H. Voskanyan H. Arzumanyan H. Hakobyan A. Nersisyan N. Saroyan D. Akopyan, M. Tatoyan J. Gazaryants M. Mkrtchyan Z. Pogosyan L. Nersesova L. Karalyan N. Karalyan Z.** Clinical and post-mortem investigations of genotype II induced African swine fever // Porcine Research, 2015 Volume 5, Issue 1, p. 1-11.

6. **Татоян М.Р.** Эмбриональный эритропоэз в селезенке // Экспериментальная и клиническая медицина, Тбилиси, 2015, N4, С. 125-127.
7. **Татоян М.Р.** Развитие сердечно-сосудистой системы в онтогенезе свиней. Вопросы теоретической и клинической медицины // Ереван, 2015, N5(102) С. 69-70.
8. **Татоян М.Р.** Особенности развития печени в эмбриогенезе свиней // Медицинская наука Армении НАН РА, т.LV N4,2015, С. 47-51.
9. **Tatoyan M., Karapetyan S., Hakobyan L., Abroyan L., Avetisyan A., Karalova E., Karalyan Z.** Ontogenesis of the erythroblastic islands in swine // Porcine Research, 2016, Volume 6, Issue 1, p.1-9.
10. **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.
11. **Татоян М.Р.** Морфофункциональные особенности развития органов кроветворения в эмбриональном периоде млекопитающих // Медицинская наука Армении НАН РА, 2016, т. LVI, №2 - С.74-85.
12. **Татоян М.Р.** Развитие эритробластических островков печени в онтогенезе свиней // Вопросы теоретической и клинической медицины, Ереван, 2016, т.19, N3(106), С. 34-36.
13. **Татоян М.Р., Арзуманян Г.А., Семерджян З.Б., Саакян К.Т., Азнаурян А.В.** Белково-синтетические процессы в раннем периоде эмбрионального гемопоэза свиней // Медицинский вестник Эребуни, 2016, №1, С. 67-69.
14. **Татоян М.Р.** Морфофункциональные и метаболические особенности эритропоэза млекопитающих. // Вопросы теоретической и клинической медицины, Ереван, 2016, т.19, №4 (107), С.14-19.
15. **Татоян М.Р.** Эритропоэз в эмбриональной печени свиньи // Медицинский вестник Эребуни, 2016, №2, С. 64-68.
16. **Karalyan Z., Zakaryan H., Arakelova E., Aivazyan V., Tatoyan M., Kotsinyan A., Izmailyan R., Karalova E.** Evidence of hemolysis in pigs infected with highly virulent African swine fever virus// Veterinary World, (2016), 9(12): 1413-1419. www.veterinaryworld.org/Vol.9/December-2016/13.pdf
17. **Tatoyan M.R., Abroyan L.O. Hakobyan L.A., Avetisyan A.S., Karalyan Z.A., Karalova Y.M.** Mesenchymal erythropoiesis in the pig ontogenesis. Porcine Research, 2016, Volume 6, Issue 2, p.64-71.
18. **Татоян М.Р., Аброян Л.О., Акопян Л.А., Аветисян А.С., Каралова Е.М.** Развитие альвеолярных макрофагов в онтогенезе свиней. Вопросы теоретической и клинической медицины, Ереван, 2017, т.20, №2 (112), С.12-14.
19. **Татоян М.Р., Аброян Л.О., Акопян Л.А., Аветисян А.С., Каралова Е.М.** Морфология и развитие клеток нормобластического эритропоэза в постнатальном периоде свиньи // Вопросы теоретической и клинической медицины, Ереван, 2017, т.20, №2 (112), С. 32-36.
20. **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 эритропоза крыс // Вопросы теоретической и клинической медицины, Ереван, 2017, т.20, №3 (113), С.9-13

21. **Karalyan Z.R., Ter-Pogossyan Z.R., Karalyan N.Yu., Semerjyan Z.B., Tatoyan M.R., Karapetyan S.A., Karalova E.M.** Hemophagocytic lymphohistiocytosis in acute African swine fever clinic // *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 187 (2017), p. 64–68.
22. **Татоян М.Р., Арзуманян Г.А., Семерджян З.Б., Саакян К.Т., Азнаурян А.В.** Эритропоз свиней в раннем периоде эмбриогенеза // Сборник научных трудов международной научной конференции «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии», М., Группа МДВ, 2016, С. 177-178.
23. **Татоян М.Р.** Морфологическая дифференцировка эритроидных клеток на разных стадиях эмбрионального развития свиней // Вопросы теоретической и клинической медицины, Ереван, 2017, т.20, №4 (114), стр. 23-27.
24. **Татоян М. Р., Аброян Л.О., Акопян Л.А., Аветисян А.С., Каралова Е.М., Каралян З.А.** Морфогенез кровяных островков на раннем этапе эмбрионального развития свиней // Вопросы теоретической и клинической медицины, Ереван, 2017, т.20, №4 (114), стр. 6-10.
25. **Tatoyan M., Abroyan L., Hakobyan L., Avetisyan A., Karalova E., Vardanyan A Karalyan Z.** The alveoli development and their cellular content during the pigs' ontogenesis // *Porcine Research*, 2017 Volume 7, Issue 1, p. 1-9.

ՄԱՐԻՆԱ ՌԱԶՄԻԿԻ ԹԱԹՈՅԱԼ

ԷՐԻԹՐՈՊՈՆԶԻ ՖԻԶԻՈԼՈԳԻԱԿԱՆ ՓՈՓՈԽՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ ԽՈՐԵՐԻ ՕՆՏՈԳԵՆԵԶՈՒՄ

ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Հետազոտական աշխատանքը նվիրված է խոզերի օնտոգենեզում էրիթրոպոեզի ուսումնասիրությանը: Առաջադրված խնդրի ուսումնասիրության համար իրականացվել է բազմակողմանի հետազոտություն, կիրառելով տարբեր մեթոդներ՝ մորֆոլոգիական, մորֆոքրմիական, ցիտոֆոտոմորֆոմետրիկ և այն: Հետազոտության արդյունքում հնարավոր եղավ բացահայտել խոզերի էրիթրոպոեզի հիմնական օնտոգենետիկ փուլերի ժամանակային սահմանների համեմատաբար ամբողջական պատկերը: Հետազոտությամբ պարզվել է, որ խոզերի էմբրիոգենեզում առաջին հերթին ձևավորվում է ներսաղմնային հեմոպոեզը, որն իր մեջ ներառում է պարասորտալ մեգենթիման և աորտոգոնադո-մեգոնեֆրալ շրջանը:

Համաձայն կիրառված մեթոդների ցույց է տրվել, որ խոզերի մեգենթիմալ էրիթրոպոեզում տարբերակվում է բջիջների երկու տեսակ՝ խոշոր պրիմիտիվ էրիթրոիդ բջիջներ և համեմատաբար փոքր՝ մեգալոբլաստներ: Տվյալ աշխատանքում առաջին անգամ հայտնաբերվել է, որ արյունային կղզյակները ձևավորվում են արդեն իսկ սաղմնային շրջանի 13-15-րդ օրը, այնուհետև 25-րդ օրը հեմոպոեզի բջիջների պրոլիֆերատիվ ակտիվությունը աստիճանաբար ցածրանում է, իսկ հղիության 35-րդ օրը անհետանում է, ինչն էլ հաստատում է խոզերի մեգենթիմալ էրիթրոպոեզի ավարտման մասին մեր կողմից ստացված տվյալներով:

Ուշագրավ է այն փաստը, որ հղիության 15-25-րդ օրվանից սկսած ներսաղմնային արյունաստեղծման հետ մեկտեղ տեղի է ունենում արտասաղմնային դեղնուցային արյունաստեղծման գործընթաց, որտեղ էլ ձևավորվում են արյունաստեղծման օջախներ՝ արյունային կղզյակներ: Յոդունային բջիջների մի մասը վերածվում է խոշոր բազոֆիլ էրիթրոիդ բջիջների, որոնք ինտենսիվորեն բազմանում են ինչպես արյունային կղզյակներում, այնպես էլ նորաստեղծ արյունատար անոթներում, ընդ որում նրանց մեծ մասն աստիճանաբար կորցնելով բազոֆիլիան՝ վերածվում է օքսիֆիլ բջիջների: Այդ գործընթացը պայմանավորված է ցիտոպլազմայում հեմոգլոբինի սինթեզով ու կուտակումով:

Մեր կողմից հայտնաբերվել է նաև, որ խոզերի մեգալոբլաստիկ էրիթրոպոեզում ի հայտ է գալիս կորիզների էքստրուզիա և անկորիզ պրիմիտիվ էրիթրոցիտների առկայություն: Մեր տվյալներով հաստատվել է, որ խոզերի մոտ նշված բջիջների քանակը կազմում են էրիթրոիդ բջիջների ավելի քան 2-2.5%-ը: Հատկանշական է, որ բջիջների այս տիպը որոշակիանում է խոզերի էմբրիոնի զարգացման 15-25-րդ օրերին և գրեթե ամբողջովին անհետանում է հղիության 35-րդ օրը:

Մեր կողմից ցույց է տրվել, որ խոզերի էմբրիոնում յարդը ձևավորվում է հղիության 15-րդ օրվանից, իսկ արյունաստեղծումը՝ 20-րդ օրվանից սկսած: Լյարդում արյունաստեղծման գործընթացների առավելագույն ակտիվություն սկսվում է 45-65-րդ օրը: Այն հանդիսանում է էմբրիոնալ շրջանում էրիթրոպոեզի առաջատար օրգանը, արյունային կղզյակները պահպանվում են յարդում նաև խոզերի ծնունդից հետո:

Հարկ է նշել, որ յարդային էրիթրոպոեզի վաղ փուլերում արյունային կոզյակներում պրիմիտիվ էրիթրոիդ բջիջների հետ մեկտեղ հայտնաբերվել են նաև փոքր չափերի բջիջներ՝ ինչպես նորմոբլաստներ, այնպես էլ անկորիզ էրիթրոցիտներ: Խոզերի էմբրիոնում էրիթրոիդ բջիջների երկու տիպի առկայություն փաստը վկայում այն մասին, որ յարդում պրիմիտիվ էրիթրոպոեզի հետ միաժամանակ ի հայտ է գալիս նաև դեֆինիտիվ էրիթրոպոեզը:

Մեր տվյալները հիմք են տալիս պնդելու, որ էրիթրոբլաստիկ կոզյակների ձևավորման սկիզբը կարելի է համարել էմբրիոգենեզի արդեն իսկ 35-40-րդ օրը, երբ անկորիզ էրիթրոցիտների պոպուլյացիան էականորեն ավելանում է, իսկ 45-րդ օրվանից սկսած յարդում հայտնաբերվում են կենտրոնական մակրոֆագով էրիթրոբլաստիկ կոզյակներ, նաև՝ պարզվել է էրիթրոբլաստների կորիզների էկստրուզիան: Հետևաբար, յարդում աստիճանաբար հերթագայում է երկու տեսակի էրիթրոպոեզ՝ պրիմիտիվ և դեֆինիտիվ:

Խոզերի մոտ կարմիր ոսկրածուծի ձևավորումը սկսվում է էմբրիոգենեզի վաղ փուլում՝ 25-րդ օրը աճառային կմախքում, իսկ հեմոպոեզի օջախները սկսում են ձևավորվել 45-55-րդ օրը: Էմբրիոնալ ոսկրածուծն ակնհայտորեն տարբերվում է հեմոպոեզի ավելի վաղ կենտրոններից նրանով, որ միելոիդ բջիջների ձևավորումն այստեղ գերիշխում է:

Մեր կողմից բացահայտվել է նաև, որ ոսկրածուծի էրիթրոբլաստիկ կոզյակների կենտրոնական մակրոֆագերի հասունացումը բնութագրվում է կորիզներում Դ-ԼԹ-ի պարունակության աճով, ընդհուպ մինչև պոլիպլոիդ պոպուլյացիայի ձևավորումը: Ծնունդից հետո ոսկրածուծում առկա են էրիթրոբլաստիկ կոզյակների տետրապլոիդ, հիպերտետրապլոիդ և նույնիսկ օկտապլոիդ մակրոֆագեր: Ենթադրվում է, որ մակրոֆագերի պոլիպլոիդությունը, հավանաբար, կապված է էրիթրոպոեզի ակտիվացման հետ, երբ կորիզների չափերի մեծացումը ամբողջովին կապվում է բջիջների չափերի մեծացման հետ: Վերջինս բերում է արագացված ֆագոցիտոզի, իսկ էրիթրոբլաստիկ կոզյակներում՝ էրիթրոբլաստների հասունացման և կորիզների էկստրուզիայի:

Չնայած այն հանգամանքին, որ վաղ պրիմիտիվ էրիթրոիդ բջիջները, ի տարբերություն հասուն բջիջների, հեմոգլոբինի պարունակությամբ և չափսերով տարբերվում են, սակայն անհրաժեշտ է նշել, որ, հասուն բջիջների չափսերի նվազման պատճառը նրանց գումարային մակերեսի մեծացումն է, որի արդյունքում հասուն բջիջների մոտ անկասկած ավելի մեծ է գազափոխանակության արդյունավետությունը:

Մեր կողմից ուսումնասիրվել է նաև էրիթրոպոեզի կարգավորման մեխանիզմները օնոգենեզի ընթացքում և ցույց է տրվել մայրական գաղութախթանող գործոնների մասնակցությունը խոզերի սաղմնային էրիթրոպոեզում: Պարզվել է, որ ԳՄ-ԳԽԳ խթանիչ ազդեցություն ունի ոչ թե էրիթրոիդ բջիջների դիֆերենցման, այլ մակրոֆագերի ակտիվացման ու դիֆերենցման վրա, այդ թվում նաև էրիթրոբլաստիկ կոզյակների կենտրոնական մակրոֆագերի: Ընդ որում, մայրական էրիթրոպոեզի մակարոֆակները սամնային էրիթրոպոեզի կարգավորման ընթացքում էական նշանակություն չունեն:

Այսպիսով, մեր կողմից առաջին անգամ խոզերի օնոգենեզում հայտնաբերվել է էրիթրոպոեզի ձևավորման և տեղակայման հիմնական փուլերը և ժամանակային սահմանները, ինչպես նաև հետազոտվել են սաղմնային յարդի էրիթրոբլաստիկ կոզյակները և խոզերի սաղմնային էրիթրոպոեզի կարգավորման մեջ մայրական գործոնի դերը:

PHYSIOLOGICAL CHANGES OF ERYTHROPOESIS IN ONTOGENESIS OF PIGS

TATOYAN MARINA. R.

SUMMARY

The research work is dedicated to the study of erythropoiesis in ontogenesis of the pig. A comprehensive study was conducted to investigate the problem, using different methods: morphological, morphometric, cytophotometric and e.t.c. As a result of the study, we were able to most fully reveal the time frames of the main ontogenetic stages of the development of the porcine erythropoiesis.

Our study for the first time showed that in the embryogenesis of the pig is first formed, an intraembryonic zone of hematopoietic cell localization, which includes the para-aortic mesenchyme and the aorto-gonado-mesonephrine (AGM) region. Investigating the functional activity of hematopoietic cells, we first showed that in mesenchymal erythropoiesis morphologically, morphometrically and cytophotometrically distinguished two cell lines - large primitive erythroid cells and relatively small megaloblasts. Hematopoietic foci are found from 13-15 days of gestation, then gradually decreasing to 25 days, practically disappear by 35 days. The proliferative activity of hematopoietic cells of mesenchymal erythropoiesis also decreases in 25 days and practically disappears in 35 days of gestation, which confirms the data on the completion of mesenchymal erythropoiesis in pigs that we have found. These data coincide with the results of the study of the distribution nuclei of the mesenchymal cell in the ploidy class.

15-25 days of gestation, extraembryonic yolk sac hematopoiesis occurs, where similar to the intraembryonic hemopoiesis are formed - blood islands. As a result of the connection of the initially isolated islets, a vascular network of the yolk sac is formed. Part of the stem cells is converted into large basophilic cells, the so-called primary blood cells. Erythroid cells of the yolk sac actively proliferate not only in the blood island, but also in the lumen of the blood vessel and most of them gradually lose basophilia and are intensively increasingly colored with acidic dyes. This occurs in connection with the synthesis and accumulation of hemoglobin in the cytoplasm.

We have shown that in the megaloblastic erythropoiesis of pigs, in part of the cells, extrusion of nuclei and the formation of nuclear-free primitive erythrocytes is possible. According to our data, in pigs they make up no more than 2-2.5% of erythroid cells. This type of cells is determined on the 15-25th day of embryonal development and completely disappears in 35 days of gestation.

We have shown that the liver of pig embryos is formed on the 15th day, and the hematopoiesis in it begins to develop from the 20th day. The hematopoietic stem cells migrate from the yolk sac on day 25 to occupy the liver and grow together with the mesenchyme into the hepatic lobules. The maximum activity of hematopoiesis in the liver on 45-65 days. The liver is the leading organ of embryonic erythropoiesis, the individual islets of which are preserved in the liver after birth. Then the hematopoiesis in the liver gradually disappeared and replaced by bone marrow hematopoiesis.

It should be noted that in the early stages of liver erythropoiesis in the blood islands along with primitive erythroid cells, are found cells of the much smaller size, both normoblasts and non-nuclear erythrocytes. The presence of two types of erythroid cells in

embryos testifies not only to the emergence of a new (proper hepatic) cell generation, but also to the ability of these cells to undergo maturation in the structure of erythroblastic islands (EI).

The emergence of erythroblastic islets should be attributed to the 35-40 day of embryogenesis, when a significant population of non-nuclear erythrocytes is formed. And starting from the 45th day of embryogenesis, erythroblastic islets with a central macrophage are found in the liver, as well as extrusion of the erythroblast nucleus with its subsequent phagocytosis by the central macrophage of the islet. Thus, in the liver, two types of erythropoiesis - primitive and definitive - are consistently replaced.

The most important stage is erythropoiesis in the bone marrow. The formation of red bone marrow in pigs begins in the early period of embryogenesis, during the formation of the cartilaginous skeleton. Already on the 25th day of the embryonal development of the pig embryo in the cartilaginous skeleton, a cavity appears in which the stromal cells actively proliferate. The bone marrow parenchyma occurs much later. The erythroblastic islands in the bone marrow of the pig embryo begin to form only on the 45±5th day of the embryonal development. The embryonic bone marrow differs markedly from the other centers of hemopoiesis by the fact that the formation of myeloid cells here is particularly predominates.

We also found that maturation of central macrophages of erythroblastic islets of the bone marrow is characterized by an increasing in DNA content in nuclei, up to the formation of a polyploid population, and after birth in the bone marrow of pigs there are tetraploid, hypertetraploid and even octaploid macrophage populations. Polyploidization of macrophages is probably associated with the activation of erythropoiesis, when the increasing size of the nuclei is associated with an increasing of cell size as a whole. The latter leads to accelerated phagocytosis, and in erythroblastic islands, respectively, accelerates the extrusion of nuclei and maturation of erythroblasts surrounding the macrophage. Consequently, we can assume that the polyploidy of macrophages of erythroblastic islets is associated with the functional activation of erythropoiesis.

The main functional index of erythroid cells is the content of the hemoglobin. It turned out that early, more primitive cells contain more hemoglobin, compared with mature ones, however, it should be noted that their sizes also significantly exceed those of mature cells. As a consequence, the efficiency of oxygen transfer, and even more so of gas exchange due to the larger total surface, is undoubtedly much higher in mature cells.

We also carried out a study of the mechanisms of the regulation of embryonal erythropoiesis and demonstrated the involvement of maternal colony-stimulating factors in prenatal erythropoiesis of pigs. It turned out that the stimulating effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on the time scale coincides not with differentiation of the erythroid cells, but with the activation and differentiation of the macrophages, including the central macrophages of erythroblastic islets. In this case, levels of maternal erythropoietin do not play a significant role in the regulation of erythropoiesis.

Thus, we managed to clarify, and in some cases also reveal the time frame and the localization of the main stages of erythropoiesis in the ontogenesis of the pig. We show new aspects of maturation of primitive erythroid cells. For the first time, erythroblastic islets of the liver and mechanisms of regulation of prenatal erythropoiesis of the pig have been studied.