

Т.А. Коломеец, А.В. Мартынюк, Е.Ю. Шаповалова  
ГУ «Крымский государственный медицинский университет им. С.И. Георгиевского», г. Симферополь

## ФОРМИРОВАНИЕ КОЛЛАГЕНОВЫХ ВОЛОКОН ЧЕТЫРЕХ ТИПОВ В ДЕРМЕ КОЖИ ЭМБРИОНОВ ЧЕЛОВЕКА ПЕРВОГО ТРИМЕСТРА БЕРЕМЕННОСТИ

Становление коллагенового состава волокнистого каркаса дермы кожи изучено с помощью метода иммуногистохимии у 122 зародышей человека в возрасте от 21 суток до 12 недель внутриутробного развития. Первичными антителами были моноклональные антитела к коллагену I, II, III и IV типов. Получено, что в эмбриональной соединительной ткани кожи человека к 12-ти неделям эмбриогенеза присутствуют коллагеновые волокна I, II и III типов. Коллагеновые волокна IV типа не обнаружены. Наиболее многочисленны коллагеновые волокна I типа. Коллагеновые волокна II типа сосредоточены в будущем сетчатом слое, а коллагеновые волокна III типа – в сосочковом слое. Первыми в дерме кожи появляются коллагеновые волокна III типа. Коллагеновые волокна I типа обнаруживаются позднее. Коллагеновые волокна I типа повторяют динамику и гистотопографию коллагеновых волокон III типа, но их значительно меньше. Коллагеновые волокна II типа присутствуют в дерме на 11-й неделе (зародыши 46-56 мм длины) развития и заметно не увеличиваются количественно и в толщину до конца изученного периода эмбриогенеза.

**Ключевые слова:** эмбрионы человека, дерма кожи, коллагеновые волокна.

*Работа является фрагментом научно-исследовательских работ ГУ «КГМУ имени С.И. Георгиевского» и является фрагментом комплексной плановой темы “Закономерности пренатального и постнатального гисто- и органогенеза при титической и атитической имплантации и под влиянием медикаментозных препаратов. Номер государственной регистрации 0109У008095.*

Пороки развития соединительной ткани кожи – мало изученная гетерогенная группа заболеваний. Между тем, это обширная глава в дерматологии, которая, по далеко не полной классификации, включает более десяти клинических форм [10], причем среди них ряд системных заболеваний, таких как туберозный склероз, синдром Бушке-Оллендорф, псевдоксантома эластическая [3]. Соединительнотканые пороки развития обусловлены спорадическим или наследственным нарушением синтеза, чаще избыточным, коллагена и/или эластина, гиперпролиферацией фибробластов [7,11]. Для этой патологии характерно медленное прогрессирование и существование в течение всей жизни [5]. Анализ мировой литературы показывает, что сведения о биосинтезе белка коллагена, образовании на его основе коллагеновых волокон стромы дермы кожи эмбрионов человека немногочисленны, кратки и выполнены в большинстве случаев на лабораторных животных [8]. Появление современного метода иммуногистохимии позволяет с помощью моноклональных антител конкретизировать тип коллагена и сроки его появления в развивающейся коже, о чем отсутствуют сведения в доступной литературе. 19 известных типов коллагенов кодируется 33-мя генами [9]. Последовательная их активация и приводит к фенотипическому проявлению в виде появления коллагенов разных типов в эмбриональном периоде.

**Целью** работы было изучение сроков появления и локализации коллагеновых волокон I, II, III и IV типов в составе волокнистой стромы дермы кожи у зародышей человека, развивавшихся в матке при отсутствии явно выраженных повреждающих факторов внешней и внутренней среды.

**Материал и методы исследования.** Результаты работы базируются на 122 зародышах и предлодах человека в возрасте от 21 суток до 12 недель внутриутробного развития. Это дало возможность изучить зародыши человека на стадиях последовательно от раннего периода нервного желобка до начала дефинитивного плодного периода, что соответствует уровням развития по Стритеру от X до XXIII и началу плодного периода и стадиям, принятым сейчас в Институте Карнеги от 9 до 23. Ретикулярные волокна выявляли импрегнацией по Гомори [6]. Обзорные препараты окрашивали гематоксилином и эозином [4].

Иммуногистохимическое исследование проводили на серийных парафиновых срезах толщиной 5мкм, помещенных на адгезивные стекла, покрытые полилизином (“Menzel-Glaser”, Германия). Для освобождения антигенов после фиксации формалином использовали тепловую демаскировку антигенов в микроволновой печи “Sumsung” при мощности 800 Вт в течение 10 минут в цитратном буфере при pH 6,0 [2]. Для изучения разных типов коллагена первичными антителами были моноклональные антитела к коллагену I типа (Isotype Ig G1, Chemicon International), коллагену II типа (клон COLL-II, Isotype Ms Ig G1-kappa, Chemicon International), коллагену III типа (Isotype Ig G1, Chemicon International) и коллагену IV типа (клон CIV 22, Dako Cytomation). В качестве растворителя антител использовали раствор Antibody Diluent (Dako Cytomation). Дальнейшую обработку проводили с помощью системы визуализации En vision (DAKO) в течение 10 минут с каждым реактивом с биотинилированными антителами и стрептавидин-пероксидазным комплексом. Затем проводили реакцию с хромогеном DAB (Dako Cytomation), оценивая качество взаимодействия под контролем микроскопа на протяжении от 20 секунд до 3 минут. Для адекватного представления структуры ткани срезы дополнительно окрашивались гематоксилином Майера в течение 3 минут. Дегидратация и заключение в бальзам осуществлялись в соответствии с распространенными подходами. Результат расценивали как позитивный при выпадении солей хромогена красного цвета на коллагеновых волокнах дермы. С целью контроля метода была проведена серия исследований с использованием позитивных и негативных образцов, которые служили эталонами. Волокна позитивные по отношению экспрессии маркеров изучали как минимум на 5-ти срезах. В каждом из них определяли количество окрашенных в красный цвет коллагеновых волокон в 10 полях зрения на площади 502,08 мкм<sup>2</sup> (увел. x 400 микроскопа «Olympus CX-41») с помощью окулярной сетки по Г.Г. Автандилову [1].

**Результаты исследования и их обсуждение.** У зародыша в возрасте 21 суток (1,4 мм теменно-копчиковой длины) туловище покрыто однослойным кубическим эпителием с круглыми или овальными ядрами. Границы между клетками хорошо просматриваются. Эктодермальный эпителий не имеет еще четкой базальной мембраны. Местами выявляется выселение эктодермальных клеток в подлежащую мезенхиму. Такие клетки по сравнению с клетками мезенхимы имеют более светлые ядра. Они приобретают звездчатую форму и на некотором расстоянии неотличимы от других элементов мезенхимы. До 38-ми суток (10 мм длины) у зародышей прослеживается однослойный эктодермальный покров, формирующий в дальнейшем эпидермис кожи. С 38-х суток зародыш снаружи покрыт эктодермальным эпителием, который состоит из двух рядов клеток. Базальные клетки кубической формы со слабо базофильной цитоплазмой. Клеточные границы видны не везде. Большие богатые хроматином ядра имеют округлую форму. Хорошо выражена базальная мембрана. Под эпителием располагается будущая дерма кожи в виде неуплотненной мезенхимы, формирующей синцитий из отростчатых клеток. При окраске по Гомори впервые у зародышей в возрасте 47 суток (18 мм длины) между молодыми фибробластами выявляется тонкая сеточка аргирофильных волокон. Молодые фибробласты имеют удлинненную форму и слабо базофильную цитоплазму. После иммуногистохимической окраски в эмбриональной соединительной ткани дермы зародышей этого возраста между молодыми фибробластами обнаруживаются коллагеновые волокна III типа. Теперь становится ясно, что ретикулярные волокна являются коллагеновыми волокнами третьего типа. Такие волокна появляются первыми в слоях дермы, непосредственно прилежащих к эпидермису (рис. 1). Их количество, подсчитанное с помощью окулярной сетки по Г.Г. Автандилову, составляет в среднем примерно 3,1. В дальнейшем синтезируются коллагеновые волокна первого типа. Коллагеновые волокна первого типа повторяют динамику и гистотопографию коллагеновых волокон третьего типа, но их значительно меньше. На 62-е сутки (зародыши 32 мм длины) эпидермис кожи охраняет двухслойное строение. Базальный слой состоит из кубических клеток с базофильной цитоплазмой. На поверхности этих клеток лежит второй слой, образованный мелкими клетками с более темными круглыми ядрами. Базальная мембрана развита слабо. В формирующейся дерме наблюдается образование густой сети коллагеновых волокон III типа, проходящих в различных направлениях. Их количество, подсчитанное с помощью окулярной сетки по Г.Г. Автандилову, составляет в среднем примерно 6,4.

К 10-ти неделям пренатального развития (зародыши 33-45 мм длины) в дерме мезенхима полностью заместилась клетками фибробластического ряда и их количество на единицу площади уменьшилось по сравнению с ранее описанными зародышами. Помимо большого количества коллагеновых волокон III типа здесь обнаруживаются впервые коллагеновые волокна I типа (рис. 2). Их соотношение составляет 7,2:2,8. Коллагеновые волокна I типа повторяют динамику и гистотопографию коллагеновых волокон III типа, но их значительно меньше. Эпидермис по-прежнему состоит из двух слоев клеток, однако в целом толщина эпителиального пласта увеличилась.

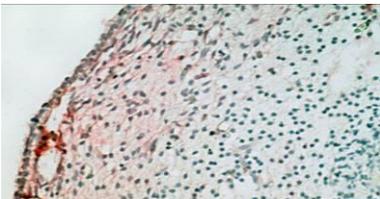


Рис. 1. Срез кожи зародыша 47 суток, 18 мм длины. Позитивная реакция на коллаген третьего типа в дерме кожи. Окраска иммуногистохимическим методом. Дополнительное окрашивание гематоксилином Майера. Визуализация в системе En vision. Увеличение: ок. 10, об. 40.

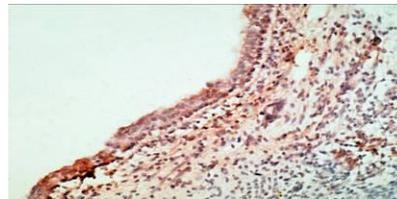


Рис. 2. Срез кожи зародыша 10 недель, 45 мм длины. Позитивная реакция на коллаген первого типа в дерме кожи. Окраска иммуногистохимическим методом. Дополнительное окрашивание гематоксилином Майера. Визуализация в системе En vision. Увеличение: ок. 10, об. 40.

На 11-й неделе пренатального онтогенеза среди коллагеновых волокон I и III типов в дерме кожи появляется тонкая сеточка коллагеновых волокон II типа. Волокна II типа локализованы в глубоких слоях дермы и не имеют контакта с эпидермисом. Соотношение коллагеновых волокон I, II и III типов составляет 3,6:2,3: 8,3. В конце изученного периода внутриутробного развития к 12-ти неделям (зародыши 70 мм длины) толщина эпидермиса заметно увеличилась. На четко видимой базальной мембране в области головы лежит 3-4 слоя кубических эпителиальных клеток со слабо базофильной цитоплазмой и округло-овальными ядрами. Поверхностные клетки несколько уплощены. В области тела предплодов эпидермис состоит из 2-3-х слоев клеток. В эмбриональной соединительной ткани дермы образовалась хорошо развитая сеть капилляров. Большинство коллагеновых волокон – это коллагеновые волокна I типа. Эти волокна образуют ориентированные пучки в глубоких слоях кожи туловища. Фиброциты здесь оксифильны, веретеновидной формы. Их базофильные ядра повторяют форму клеток. В дерме головы коллагеновые волокна тоньше и не образуют ориентированных пучков. Между коллагеновыми волокнами I типа имеются коллагеновые волокна II и III типов. Коллагеновые волокна III типа уменьшились количественно и более многочисленны в сосочковом слое дермы, а коллагеновые волокна II типа – в будущем сетчатом слое дермы. В среднем соотношение коллагеновых волокон I, II и III типов составляет 7,9:2,6:5,8. Коллагеновые волокна IV типа не выявляются.

## Выводы

1. В эмбриональной соединительной ткани кожи человека к 12-ти неделям эмбриогенеза присутствуют коллагеновые волокна I, II и III типов. Коллагеновые волокна IV типа не обнаружены.

2. В дерме кожи человека к 12-ти неделям эмбриогенеза наиболее многочисленны коллагеновые волокна I типа. Коллагеновые волокна II типа сосредоточены в будущем сетчатом слое, а коллагеновые волокна III типа – в сосочковом слое.
3. Первыми в дерме кожи появляются коллагеновые волокна III типа. Коллагеновые волокна I типа обнаруживаются позднее. Коллагеновые волокна I типа повторяют динамику и гистотопографию коллагеновых волокон III типа, но их значительно меньше.
4. Коллагеновые волокна II типа присутствуют в дерме на 11-й неделе (зародыши 46-56 мм длины) развития и заметно не увеличиваются количественно и в толщину до конца изученного периода эмбриогенеза.

*Перспективы дальнейших исследований. Изучение особенностей становления коллагенового каркаса дермы кожи на основе методов иммуногистохимии в раннем эмбриогенезе поможет вскрыть закономерности нормального развития этого органа, нарушающегося при фомировании пороков развития соединительной ткани кожи.*

#### Литература

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия / Г.Г. Автандилов // – Москва: Медицина, 1991. – 380 с.
2. Коржевский Д.Э. Применение методов теплового демаскирования антигенов на парафиновых срезах головного мозга крысы / Д.Э. Коржевский, Е.А. Юмкина // Морфология. – 2005. – Т. 127, № 2. – С. 76-77.
3. Мордовцев В.Н. Наследственные заболевания кожи / В.Н. Мордовцев, К.Н. Суворова // – Алма Ата, 1995. – 70 с.
4. Марковский В.Д. Руководство по гистологической, гистохимической и иммуногистохимической технике / Марковский В.Д., Сорокина И.В., Гольева Н.В. [и др.] // – Харьков, 2010. – 151 с.
5. Пономарев А.А. Редкие кожно- висцеральные синдромы / А.А. Пономарев, Е.П. Куликов, Н.С. Караваев // – Рязань, 1998. – 600 с.
6. Семченко В. В. Гистологическая техника / В. В. Семченко, С. А. Барашкова, В. И. Ноздрин // – Омск, 2006. – 289 с.
7. Giro Gabriella M. Buschke-Ollendorff syndrome associated with elevated elastin production by affected skin fibroblasts in culture / Gabriella M. Giro, Madeleine Duvis, T. Lyme // The journal of investigative dermatology. – 1992. – Vol. 99, N 2. – P. 129-137.
8. Gautam R.K. Isolated collagenoma: a case report with a review of connective tissue nevi of the collagen type. II / R.K. Gautam, H.K. Kar, R.K. Jain // J Dermatol. – 1996. – Vol. 23, N 7. – P. 476-478.
9. Myers J.C. Biochemical and immunohistochemical characterization of human type XIX defines a novel class of basement membrane zone collagens / J.C. Myers, A. Bageris, V. Abraham // Am. J. Pathol. – 1997. – Vol. 151, N 6. – P. 1729-1740.
10. Pierard G.E. Nevi of connective tissue a reappraisal of their classification / G.E. Pierard, Charles V. Lapiere // The American journal of dermatopathology. – 1985. – Vol. 7, N 4. – P. 325-333.
11. Zars B. Connective tissue nevus / B. Zars, D.D. Strachan // Medicine Journal. – 2001. – № 2. – С. 5-7.

#### Реферати

##### ФОРМУВАННЯ КОЛАГЕНОВИХ ВОЛОКОН ЧОТИРЬОХ ТИПІВ В ДЕРМІ ШКІРИ ЕМБРІОНІВ ЛЮДИНИ ПЕРШОГО ТРИМЕСТРА ВАГІТНОСТІ

Коломосец Т. А., Мартинюк О.В., Шаповалова О. Ю.

Становлення коллагенового складу волокнистого каркасу дерми шкіри вивчене за допомогою методу імуногистохімії у 122 зародків людини у віці від 21 доби до 12 тижнів внутріутробного розвитку. Первинними антитілами були моноклональні антитіла до колагену I, II, III і IV типів. Отримано, що в ембріональній сполучній тканині шкіри людини до 12-ти тижнів ембріогенезу присутні коллагенові волокна I, II і III типів. Коллагенові волокна IV типу не виявлені. Найбільш численні коллагенові волокна I типу. Коллагенові волокна II типу зосереджені в майбутньому сітчастому шарі, а коллагенові волокна III типу – в сосочковому шарі. Першими в дермі шкіри з'являються коллагенові волокна III типу. Коллагенові волокна I типу виявляються пізніше. Коллагенові волокна I типу повторюють динаміку і гистотопографію коллагенових волокон III типу, але їх значно менше. Коллагенові волокна II типу присутні в дермі на 11-му тижні (зародки 46-56 мм довжини) розвитку і помітно не збільшуються кількісно і в товщину до кінця вивченого періоду ембріогенезу.

**Ключові слова:** ембріони людини, дерма шкіри, коллагенові волокна.  
Стаття надійшла 15.02.2013 р.

##### FORMATION OF COLLAGEN FIBERS OF FOUR TYPES IN SKIN DERMIS OF HUMAN EMBRYOS OF THE FIRST TRIMESTER OF PREGNANCY

Kolomoietz T. A., Martinyuk A.V., Shapovalova Ye. Yu.

Becoming of collagen composition of fibril framework of skin dermis was studied by the method of immunohistochemistry on 122 human embryos in age from 21 days to 12 weeks of intrauterine development. Primary antibodies were monoclonal antibodies to the collagen types I, II, III and IV. It was received, that in 12 weeks of embryogenesis embryonic connective tissue of skin dermis consisted of collagen fibers types I, II and III. The collagen fibers of the type IV were absent. The collagen fibers type I are most numerous. The collagen fibres type II are concentrated in the future reticular layer, and collagen fibres type III are concentrated in papillary layer. The collagen fibers type III appeared first in skin dermis. The collagen fibers type I are revealed here later. The collagen fibers type I repeated histotopography of collagen fibers type III, but they considerably less. Collagen fibers type II were in dermis after 11 weeks of gestation (embryos 46-56 mm of length) and notably not increased in number and in a thickness to the end of the studied period of embryogenesis.

**Key words:** human embryos, dermis of skin, collagen fibers.

УДК: 616.36-004:616.24-06:616.155.3-008.13]-092.9

І. Я. Криницька

ДВНЗ України «Тернопільський державний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського», м. Тернопіль

##### РІВЕНЬ АПОПТИЧНО- ТА НЕКРОТИЧНО ЗМІНЕНИХ МОНОЦИТІВ ТА АЛЬВЕОЛЯРНИХ МАКРОФАГІВ ЗА УМОВИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ГЕПАТОПУЛЬМОНАЛЬНОГО СИНДРОМУ

Досліджено вплив двох експериментальних моделей гепатопульмонального синдрому на рівень апоптично- та некротично змінених моноцитів крові та альвеолярних макрофагів бронхоальвеолярного змиву. Встановлено, що у щурів обох експериментальних груп достовірно зростає відсоток моноцитів крові та альвеолярних макрофагів бронхоальвеолярного змиву з ознаками клітинної загибелі.

**Ключові слова:** гепатопульмональний синдром, моноцити, альвеолярні макрофаги, апоптоз, некроз.

*Робота є фрагментом науково-дослідної роботи «Біохімічні механізми токсичності наночастинок різної природи та інших антропогенних і біогенних токсикантів на біологічні системи», № держ. реєстрації 0112U000542.*

У даний час зрозуміло, що пошкодження печінки супроводжується загибеллю клітин печінки, часто шляхом апоптозу чи некрозу [10]. Апоптоз являє собою енергозалежний процес, необхідний для підтримки гомеостазу тканин та регуляції оптимальної кількості клітин шляхом елімінації надлишкових чи функціонально