

УДК 611.778:611–018:616.5–003.92

© А. В. Мартынюк, Ю. Г. Барановский, Е. Ю. Шаповалова, 2013

## ЭКСПРЕССИЯ СИАЛО- И N-АЦЕТИЛ-D-ГЛЮКОЗАМИНОКОНЪЮГАТОВ В РАННЕМ ОРГАНОГЕНЕЗЕ КОЖИ У ЭМБРИОНОВ ЧЕЛОВЕКА И В СТРУКТУРАХ КЕЛОИДНЫХ РУБЦОВ

**А. В. Мартынюк, Ю. Г. Барановский, Е. Ю. Шаповалова**

*Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав.— проф. Е. Ю. Шаповалова), ГУ «Крымский государственный медицинский университет им. С. И. Георгиевского». 95006 Украина, г. Симферополь, бул. Ленина 5/7. E-mail: Shapovalova\_L@mail.ru*

### EXPRESSION OF SIALO- AND N-ACETYL-D-GLUCOSAMINOCONUGATES IN EARLY ORGANOGENESIS OF SKIN OF HUMAN EMBRYOS AND IN THE STRUCTURES OF KELOID SCARS

A. V. Martynuk, Yu. G. Baranovskiy, Ye. Yu. Shapovalova

#### SUMMARY

In 122 human embryos at the age of 21 days to 12 weeks of the intrauterine development, which includes stage X — XXIII and beginning of the fetal period by classification of Carnegie institute, and in 14 postoperative keloid scar natural redistribution of glycopolymers — receptors of wheat germ lectin have been studied in epithelial and mesenchymal germs of the skin and the four areas of keloid scars. Found that the epithelial cells of the skin on the developmental stages have a large number of receptors of lectin wheat germ. Undifferentiated skin mesenchyme has many WGA-positive material in the cell cytoplasm and cytolemma. Mesenchymal differentiation leads to a gradual reduction of lectin receptors in the cytoplasm and preserve them in large numbers on cytolemma. Fibroblasts of keloid scars growth areas, which is the keloid tissue itself, as opposed to other areas, synthesize a large number of glycopolymers with a non-reducing terminal residues of N-acetyl-D-glucosamine and sialic acid.

### ЕКСПРЕСІЯ СИАЛО- ТА N-АЦЕТИЛ-D-ГЛЮКОЗАМІНОКОН'ЮГАТИВ В РАНЬОМУ ОРГАНОГЕНЕЗІ ШКІРИ У ЕМБРІОНІВ ЛЮДИНИ І В СТРУКТУРАХ КЕЛОЇДНИХ РУБЦІВ

О. В. Мартинюк, Ю. Г. Барановський, О. Ю. Шаповалова

#### РЕЗЮМЕ

У 122 зародків людини у віці від 21 доби до 12 тижнів внутріутробного розвитку на стадіях послідовно від раннього періоду нервового жолобка до початку дефінітивного плодового періоду по класифікації інституту Карнегі і 14 післяопераційних келоїдних рубців виявлений закономірний перерозподіл глікополімерів — рецепторів лектину зародків пшениці в епітеліальних і мезенхімних закладах шкіри і чотирьох зонах келоїдних рубців. Отримано, що епітеліоцити шкіри на етапах свого розвитку мають велику кількість рецепторів лектину зародків пшениці. Малодиференційована мезенхіма зачатка шкіри має багато WGA-позитивного матеріалу в цитоплазмі і цитолемме клітин. Диференціювання мезенхіми веде до поступової редукції рецепторів лектину в цитоплазмі і збереження їх в значній кількості на цитолемме. У келоїдних рубцях фіброласти зони зростання, що є власне келоїдною тканиною, на відміну від інших зон, синтезують велику кількість глікополімерів з кінцевими нередукованими залишками N-ацетіл-D-глюкозаміна і сіалової кислоти.

**Ключевые слова:** эмбриональный гистогенез человека, гликополимеры, лектины, кожа, келоидные рубцы.

Анализ научной литературы показал, что прикладным и клиническим аспектам изучения раневого процесса посвящено много работ [8]. Большой фактический материал, накопленный к настоящему времени, свидетельствует о том, что в основе регенераторного гистогенеза лежат процессы физиологической регенерации [4]. Своеобразие течения репаративного гистогенеза в тканях различного генеза во многом определяется биологией ткани [3]. Конкретные ткани реализуют свои регенераторные возможности в соответствии с общими закономерными процессами эмбрионального гистогенеза [2]. Считается, что развитие келоида связано с тем, что на фоне ряда общих и местных факторов в зонах роста чрезмерно активны механизмы гистогенеза эмбрионального типа [5, 6]. До сих пор не проведены параллели между гистогенезом келоидных рубцов и ранним эмбриональным гистогенезом

мезенхимных закладок кожи человека, когда происходит дифференцировка фибробластов и усиленный синтез ими коллагеновых волокон и межклеточного вещества — основы дермы кожи.

Гисто- и морфогенез зародыша протекает при участии лектин-рецепторных систем в регуляции агрегации и миграции клеток, в образовании структурных и функциональных контактов между отдельными группами клеток [12, 13], а также некоторые факторы роста клеток имеют структурное и функциональное сходство с растворимыми лектинами [10]. Изменение гистотопографии и состава связывающих лектины гликоконъюгатов в пренатальном онтогенезе отражает последовательность включения различных механизмов, обеспечивающих дифференциацию и нормальное функционирование органов [9, 11].

Целью работы явилось изучение репрессии и де-репрессии гликополимеров с концевыми нередуциру-

ющими остатками сиало- и N-ацетил-D-глюкозамина на последовательных этапах морфогенетических преобразований эпителиального и мезенхимного зачатка кожи у зародышей человека и в структурах келоидных рубцов.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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. Изучено также 14 пациентов хирургического отделения КРУКБ им. Н. А. Семашко и хирургического отделения Луговской ЦРБ. Больные находились на стационарном лечении в связи с необходимостью проведения различных повторных оперативных вмешательств в месте предшествующей операции. Патологический материал брали интраоперационно. Иссекался послеоперационный келоидный рубец и из него вырезали биопсийный материал. Материал и эмбрионы заливали в парафин и из них изготавливали серийные срезы толщиной 5–6 мкм.

Для лектиногистохимического исследования серийные срезы после депарафинизации погружали в 96 градусный этанол, а затем для инактивации эндогенной пероксидазы инкубировали 20 минут в метаноле, содержащем 0,3% перекиси водорода. Препараты обрабатывали с применением стандартных наборов НПК «Лектинотест» г. Львов в разведении лектина 1:50 по рекомендуемой методике [7]. Визуализацию мест связывания лектина проводили в системе диаминобензидин-перекись водорода. Контроль специфичности реакции осуществляли путем исключения из схемы обработки препаратов диаминобензидина. Для обработки гистологических препаратов использовали лектин зародышей пшеницы (WGA), специфичный к N-ацетил-D-глюкозамину и сиаловой кислоте. Сокращенное наименование лектинов приведено в соответствии с международной номенклатурой лектинов [1]. Интенсивность окрашивания срезов различными лектинами оценивалась в баллах методом полуколичественной оценки. Баллы 0, 1, 2, 3, 4 — соответственно отсутствие, слабая, умеренная, сильная и очень сильная реакции.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В молодых келоидных рубцах определяется четыре зоны: эпидермис, субэпидермальная зона,

Таблица 1.

#### Содержание рецепторов лектинов зародышей пшеницы (WGA) в структурах молодых келоидных рубцов\*

| Название структуры               | WGA |
|----------------------------------|-----|
| Эпидермис                        |     |
| Клетки базального слоя цитолемма | 3   |
| цитоплазма                       | 1   |
| Клетки шиповатого слоя цитолемма | 2   |
| цитоплазма                       | 0   |
| Клетки зернистого слоя цитолемма | 2   |
| цитоплазма                       | 1   |
| Клетки рогового слоя цитолемма   | 3   |
| цитоплазма                       | 3   |
| Дерма                            |     |
| Субэпидермальная зона волокна    | 3   |
| Клетки цитолемма                 | 3   |
| цитоплазма                       | 3   |
| Зона роста волокна               | 4   |
| Клетки цитолемма                 | 4   |
| цитоплазма                       | 4   |
| Глубокая зона волокна            | 2   |
| Клетки цитолемма                 | 3   |
| цитоплазма                       | 3   |

\*Интенсивность развившейся реакции оценивали в баллах: 0 — отсутствие реакции, 1 балл — очень слабая реакция, 2 балла — слабая реакция, 3 балла — умеренная реакция, 4 балла — сильная реакция.

| Количественное содержание рецепторов лектин зародышей пшеницы в коже зародышей человека* |   |     |     |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | Таблица 2 |    |
|--|---|-----|-----|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----------|----|
| Название структуры   | Теменно-копчиковая длина зародышей в мм |     |     |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |           |    |
|  | 5,5                                     | 5,5 | 6,5 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 16 | 17 | 18 | 20 | 21 | 23 | 25 | 27 | 30 | 32 | 45 | 56        | 70 |
| Эпидермис апикальная поверхность   | 2                                       | 3   | 3   | 3 | 4  | 4  | 4  | 4  | 4  | 4  | 4  | 3  | 3  | 3  | 3  | 3  | 3  | 3  | 3  | 3  | 3         | 3  |
| базальная поверхность М и ЭСТ кожи   | 2                                       | 3   | 3   | 4 | 4  | 4  | 4  | 4  | 4  | 3  | 3  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  | 1  | 0  | 0  | 0         | 0  |
| цитолемма  | 0                                       | 0   | 0   | 0 | 4  | 4  | 4  | 4  | 4  | 4  | 4  | 4  | 4  | 4  | 4  | 4  | 4  | 4  | 3  | 3  | 3         | 3  |
| цитоплазма   | 3                                       | 3   | 3   | 3 | 3  | 3  | 3  | 3  | 3  | 3  | 3  | 2  | 2  | 2  | 2  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 0         | 0  |

\*Интенсивность развившейся реакции оценивали в баллах: 0 — отсутствие реакции, 1 балл — очень слабая реакция, 2 балла — слабая реакция, 3 балла — умеренная реакция, 4 балла — сильная реакция.

зона роста и глубокая зона. Цитолемма клеток базального слоя эпидермиса накапливает большое количество рецепторов лектина зародышей пшеницы (табл. 1). Цитоплазма значительно беднее, в ней прослеживаются следы бензидиновой метки. Цитолемма клеток шиповатого и зернистого слоев имеет небольшое количество сиалированных гликополимеров и N-ацетил-D-глюкозаминоконъюгатов. Клетки рогового слоя богаты WGA-положительным материалом.

Три слоя дермы, отличающиеся по строению, проявляют различное сродство к данному лектину. Все компоненты (клетки и коллагеновые волокна) субэпидермального слоя богаты рецепторами лектина. В зоне роста концентрация мест связывания лектина самая высокая. В глубокой зоне интенсивность бензидиновой метки на коллагеновых волокнах заметно снижается. Цитолемма и цитоплазма фибробластов также проявляет меньшее сродство к данному лектину.

В конце первого и начале второго месяца внутриутробной жизни эпителиоциты наружного покрова зародыша нарастающе синтезируют гликополимеры, являющиеся рецепторами лектина зародышей пшеницы (табл. 2).

Первоначально такие соединения имеются на апикальной поверхности и диффузно заполняют цитоплазму клеток. В более старшем возрасте бензидиновая метка откладывается в значительном количестве на базальной мембране, апикальной поверхности и в цитоплазматических включениях, окруженных мембраной. В конце второго месяца и на третьем месяце эмбриогенеза (зародыши 23–70 мм длины) в эпидермоцитах происходит дальнейшее изменение биосинтеза гликополимеров, связанное с дифференцировкой. Оно проявляется редукцией и перераспределением рецепторов лектина зародышей пшеницы. В эпителиоцитах в конце

второго месяца WGA<sup>+</sup> гликополимеры присутствуют в значительных количествах на апикальной поверхности, в базальной мембране и в плазматических мембранах цитоплазматических включений. К концу третьего месяца (зародыши 57–70 мм длины) WGA-положительные соединения присутствуют только на апикальной поверхности и на цитолемме эпидермальных эпителиоцитов.

На ранних этапах развития (зародыши 24–37 суток, 3,2–9 мм) мезенхимные элементы под эпителиоцитами наружного покрова обладают одинаковой способностью диффузно концентрировать в цитоплазме клеток в значительных количествах гликополимеры с концевыми нередуцирующими остатками N-ацетил-D-глюкозамина и N-ацетилнейраминовой кислоты. Межклеточное вещество свободно от таких соединений. Дальнейшая дифференцировка мезенхимы в течение первой половины второго месяца (зародыш 38–46 суток, 10–17 мм длины) связана с перемещением и преимущественным накоплением гликополимеров, тропных к лектину зародышей пшеницы, на цитолемме клеток периэпителиальной мезенхимы и в меньшей степени — в цитоплазме. Дифференцировка клеток периэпителиальной мезенхимы в молодые фибробласты, начало синтеза ими аргирофильных волокон сопровождается постепенной редукцией рецепторов лектина зародышей пшеницы в цитоплазме. Этот процесс не затрагивает цитолемму.

Таким образом, на ранних этапах развития кожи ее закладки синтезируют значительное количество сиалированных гликополимеров и гликополимеров с терминальными остатками N-ацетил-D-глюкозамина. К концу изученного периода просматривается постепенная редукция обоих гликополимеров.

## ВЫВОДЫ

1. Эпителиоциты кожи на этапах своего развития имеют большое количество гликополимеров с концевыми нередуцирующими остатками N-ацетил-D-глюкозамина и в меньшей степени — N-ацетилнейраминовой кислоты. Развитие и рост зародыша ведет к полной редукции рецепторов лектина зародышей пшеницы на базальной мембране эпидермиса.

2. Малодифференцированная мезенхима зачатка кожи имеет много WGA-позитивного материала в цитоплазме и цитолемме клеток. Дифференцировка мезенхимы ведет к постепенной редукции рецепторов лектина в цитоплазме и сохранению их в значительном количестве на цитолемме.

3. В келоидных рубцах фибробласты зоны роста, представляющей собой собственно келоидную ткань, в отличие от других зон, синтезируют большое количество гликополимеров с концевыми нередуцирующими остатками N-ацетил-D-глюкозамина и сиаловой кислоты.

## ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Использование лектинов как структурно-функциональных зондов поможет выяснению значения и характера трансформации нормального регенераторного гистогенеза в келоидообразование, проявляющего черты эмбрионального гистогенеза кожи.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Антонюк В. О. Лектины та їх сировинні джерела / В. О. Антонюк. — Львів: ПП «Кварт», 2005. — 554 с.
2. Волкова О. В. Эмбриогенез и возрастная гистология внутренних органов человека / О. В. Волкова, М. И. Пекарский. — М.: Медицина, 1976. — 416 с.
3. Данилов Р. К. Экспериментально-гистологический анализ гистогенеза и регенерации тканей: достижения и перспективы дальнейших исследований / Р. К. Данилов // Морфологические основы гистогенеза и регенерации тканей. — СПб., 2001. — С. 3–4.
4. Данилов Р. К. Гистологические критерии оценки течения регенерационного процесса при

огнетрельном повреждении органов опорно-двигательного аппарата / Р. К. Данилов, В. Г. Гололобов, Г. Я. Графова // Вестник Российской Военно-медицинской академии (приложение) ю — 2007. — Т. 17, № 1, Ч. 2. — С. 557.

5. Косов И. С. Изучение влияния фактора роста фибробластов на заживление кожных ран // Дис. к. м. н. — М., 1994.

6. Линарес Х. А. Лечение гипертрофий: спорные и этиопатогенетические аспекты / В кн.: Капва-ял Х. Ф., Паркс Д. Х. Ожоги у детей / Пер. с англ. — М.: Медицина, 1990. — 512 с.

7. Луцик А. Д. Лектины в гистохимии / А. Д. Луцик, Е. С. Детьюк, М. Д. Луцик. — Львов.: Вища школа, 1989. — 139 с.

8. Чепурненко М. Н. Иммуногистохимический анализ заживления кожной раны / М. Н. Чепурненко // Применение современных методов анализа в изучении структуры и функции клетки: матер. междунар. симпозиума. — Архангельск, 2007. — С. 28.

9. Ariano M. C. Peanut lectin receptor, and carcinoembryonic antigen distribution in keratoacanthomas, squamous dysplasias, and carcinomas of skin / M. C. Ariano, E. L. Wiley, Ariano L. H. // J Dermatol Surg Oncol. — 1985. — Vol. 11, N11. — P. 1076–1083.

10. Caron M. Cell growth factor and soluble lectins / M. Caron, R. Joubert, D. Bladier // TIBS. — 1986. — N11. — P.319.

11. Franceschini V. Histochemical study by lectin binding of surface glycoconjugates in the developing olfactory system of rat / V. Franceschini, M. Lazzari, K. P. Revoltella // Int. J. Dev. Neurosci. — 1994. — Vol.12, N3. — P. 197–206.

12. Harrison F. L. Endogenous B-galactoside-specific lectins in rabbit tissues / F. L. Harrison, J. E. Fitzgerald, J. W. Catt // J. Cell Sci. — 1984. — Vol.72. — P.147–162.

13. Regan L. J. Selective expression of endogenous lactose-binding lectins and lactoseries glycoconjugates in subsets of rat sensory neurons / L. J. Regan, J. Dodd, H. Barondes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1986. — Vol.83, N7. — P. 2248–2252.