

Summary

LIPID PEROXIDATION AND ANTIOXIDANT DEFENSE IN RATS' DIGESTIVE ORGANS IN INFLUENCE OF USED MINERAL-BASED CRANKCASE OIL UNDER CHRONIC SODIUM NITRATE INTOXICATION

Batuhina I.V.

Key words: used mineral-based crankcase oil, chronic intoxication with sodium nitrate, lipid peroxidation, antioxidant defense, periodontium, stomach, small intestine.

In experiment on 40 white rats it has been revealed introduction of mineral-based crankcase oil under 60-days sodium nitrate intoxication activates lipid peroxidation in the digestive organs tissues. It increases concentration TBA- reactants before incubation in the tissues of periodontium as well as gastric mucosa, and small intestine. These changes haven't been revealed in isolated introduction named substances. The introduction of the ones is characterized by the interpotentiation in superoxide dismutase inhibition in the tissues of gastric mucosa and small intestine.

УДК 611.018.7

ІМУНОГІСТОХІМІЯ ЕПІТЕЛІУ ЕНТОДЕРМИ РАНЬОГО ЕМБРІОГІСТОГЕНЕЗУ

Гасюк Ю.А., Ніколенко Д.Є, Гриценко П.О.

Вищий державний навчальний заклад України "Українська медична стоматологічна академія"

*Вивчено комплексно гістогенез епідермісу раннього пренатального періоду людини. Імуногістохімічно виявлено різний ступінь експресії біомаркерів p63, bcl-2, p53, VEGF в клітинних елементах шкіри ембріону. Припускається регулюючий вплив як амніону, так і підлеглої мезенхіми на диференціювання ембріонального епідермісу.*

**Ключові слова:** імуногістохімія, епідерміс, ембріогістогенез.

Вступ

Сучасний аналіз розвитку ектодерми раннього пренатального періоду передбачає різнобічну її характеристику на різних структурно-функційних рівнях. Такий підхід морфолога має служити основою для подальшого розуміння шляхів розвитку похідних ектодерми, зокрема, гортані, легенів та молочної залози в пренатальнім періоді. Морфологічні етапи ембріогістогенезу ектодерми передують утворенню її похідних [4,7,11].

На думку дослідників [6,7], первинний епідерміс рекапітулює основні етапи еволюції кутикулярного епітелію і, як наголошують автори, завжди закладається у зародках хребтових, як одношаровий, далі стає двошаровим з утворенням перидерми, яка має в подальшому десквамуватись.

При цьому ектодерма як гранична (суміжна) структура, зазнає впливу мінливих умов трофіки ембріону: зовнішнього середовища його перебування ( рідина амніотичної порожнини) та підлеглої мезенхіми, на що слід звернути увагу.

Безперечно, відбувається морфологічна диференціація ембріонального покривного епітелію у бік утворення деяких специфічних структур: з одного боку, утворюючи захист від набухання у водному середовищі ембріона, а з другого – продовження взаємодії ектодерми та підлеглої мезенхіми. Останнє спрямовано на органогенез – за рахунок інтегративних взаємовідношень [ 7].

Разом із тим, на нашу думку, потребує уточнення розвитку і диференціювання ембріонального епідермісу в ранньому пренатальному періоді людини на більш глибокому сучасному структурно-функційному рівні – імуногістохімічному.

Мета роботи

Провести дослідження гістохімічних та імуногістохімічних особливостей загальних етапів розвитку ектодерми шкіри ембріонів раннього пренатального періоду, котрі є превентивним матеріалом як для її похідної – молочної залози, так і зачатків органів передньої головної кишки (легені, гортань, стравохід).

Матеріал та методи

Вивчено ектодерму шкіри людських ембріонів (шматочки абортівного матеріалу, надіслані для гістологічного дослідження в Полтавське обласне патологоанатомічне бюро) 4-6 тижнів розвитку (3) та 8-12 тижнів розвитку (5) прицільно в зоні мамілярних ліній від пахвової до пахвинної зони з вентро-латеральною вирізкою матеріалу. Для оглядової мікроскопії користувались забарвленням гематоксиліном та еозином. Морфометричне дослідження первинного епідермісу у вигляді каріометрії, на 200 клітинах у кожному випадку, проводилось з визначенням великого та малого діаметру ядер клітин та обробкою десятичного логарифмування за формулою для обертаючого овоїда [1,2,13]. Гістохімічне забарвлення проводили Нільським блакитним та ШИК-реакція на парафінових зрізах.

Імуногістохімічне дослідження проведено в сертифікованій імуногістохімічній лабораторії патологоанатомічного бюро міста Дніпропетровська ( зав. лабораторією проф. Шпонька І.С.). Дофарбування ядер клітин виконували гематоксилином Майєра. Шматочки тканини ембріона фіксували 10% забуференим формаліном впродовж 22 годин, виконували прискорене зневоднення у спиртах висхідної концентрації, заливали в парафін при t + 58°C і виготовляли зрізи то-

вщиною 5 мкм. Імуногістохімічні реакції проводили з використанням моноклональних антитіл: VEGF (клон VG1, DakoCytomation), p63 (клон 4A4, DakoCytomation), онкопротеїну p53 (клон DO-7, DakoCytomation), онкопротеїну bcl-2 (клон 124, DakoCytomation).

Фотозйомка мікропрепаратів проводилась цифровою фотокамерою мікроскопу «Olympus».

### **Результати та їх обговорення**

На підставі проведених комплексних досліджень встановлено, що кожному етапу ембріогенезу відповідає певний морфологічний вид епітелію. Так в ранньому (4-6 тижнів) ембріональному періоді розвитку ектодерми виявлено два етапи диференціювання, для котрих притаманні специфічні структурно-функційні особливості. Відповідно, на першому етапі похідним ектодерми є кутикулярний епітелій, а потім його змінює псевдобагаторядний епітелій.

При оглядовій мікроскопії кутикулярного епітелію тулуба ембріону 4-6 тижнів розвитку, забарвленого гематоксиліном та еозином, виявлено поширене розміщення клітин. При чому верхній шар займають клітини з видовженими, темнозабарвленими фіолетовими ядрами та вузьким обідком рожевої цитоплазми з перинуклеарною базофілією. Зовнішньою поверхнею з одного боку дані клітини контактують з водним середовищем амніону, з другого – підлеглим шаром так званих базальних клітин. Більший діаметр ядер цих клітин орієнтований паралельно до підлеглої структури, підтримуючи горизонтальний анізоморфізм. При гістохімічному забарвленні Нільским-блакитним, в цитоплазмі клітин виявлені вакуолі синього кольору, що вказує на вміст в ній фосфоліпідів.

Під попереднім шаром розташовані клітини з округлими та видовженими темно- і світлофіолетовими ядрами. Таке забарвлення, вочевидь, пов'язано з різноманітним конформаційним станом гетерохроматину і свідчить про проходження цими клітинами різних стадій клітинного циклу.

Базально розташовані клітини контактують з підлеглою рихлою мезенхімою, або втрачають контакт із нею, вступаючи до мітозу. Ядра даних клітин розташовані більшим діаметром перпендикулярно відносно підлеглої мезенхіми (вертикальний анізоморфізм) і не мають безпосереднього контакту з амніотичним середовищем. Гістохімічно виявлено ШИК-позитивне забарвлення в перинуклеарній зоні гранул глікогену в базальному шарі епітелію, а також виражена базальна мембрана під нижнім шаром епітелію.

Підлегла мезенхіма ектодерми має безліч активно проліферуючих ембріональних зірчастих клітинних елементів з гіперхромними ядрами. Останнє свідчить про наявність транскрипційно-неактивного конденсованого хроматину. Спостерігається хаотична просторова орієнтація ядер мезенхімальних клітинних елементів. Це

свідчить, більш за все, про відсутність сформованих міжклітинних контактів серед незрілої мезенхіми. При цьому відростки клітин також містять фосфоліпідні синього кольору за Нільским-блакитним. Саме останні, за даними літератури [12], приймають участь у формуванні базальної мембрани.

Для підтвердження виявлених ознак і типування клітинних елементів кутикулярного епітелію, нами проведена каріометрія останнього. При цьому були виявлені ядерні класи в інтервалі LgV ядра 0,5;0,8;1,1 [1;2;9]. В інтервалі LgV 0,5 знаходились ядра клітин базального шару і, як мінімальній ядерний клас, згідно закону Вермеля [ ], належить камбіальним клітинним елементам. Останні відтворюють себе, та дають початок більш диференційованій клітинній структурі. В інтервалі LgV 0,8 знаходились ядра поверхнево розташованого власне кутикулярного епітелію. Нарешті, ядерний клас з LgV 1,1 відповідав клітинам проміжного шару. Даний логарифмічний ряд ядер клітин, згідно закону ритмічного зростання ядер Якобі (1935 рік), свідчить про динамічне збільшення розподілу хромосом і ДНК в них. Вищеописаний логарифмічний ряд ядерних структур кутикулярного епітелію характеризує як ритмічне збільшення об'єму ядер проміжного шару по відношенню до базально розташованого епітелію в 4 рази, так і зменшення в 2 рази об'єму ядер поверхневого епітелію.

З метою підтвердження і уточнення результатів гістохімічних, каріометричних досліджень, нами проведений імуногістохімічний аналіз даного ембріонального покривного епітелію з використанням маркерів: p63, p53, bcl-2, VEGF.

Реакція із сироваткою до білка проонкогена p63 відомого, як маркера ембріональних, стовбурових та недиференційованих епітеліальних клітин дорослого організму [8,16,17], була у вигляді різного ступеню вираженої позитивної внутрішньоядерної експресії. При цьому базально розташовані клітини мали найбільш виражену позитивну ядерну реакцію (+++), що свідчить про їх належність до недиференційованих камбіальних елементів. Ядра клітин проміжного шару ембріонального епідермісу мали, на відміну від попередніх, як виражену позитивну (+++), так і помірно позитивну (++) реакцію, демонструючи зниження інтенсивності експресії p63 по мірі віддалення клітин від умовної базальної мембрани та тенденцію диференціювання останніх. Нарешті, ядра епітелію поверхневого шару мали негативну реакцію (-) експресії даного проонкогена, що пов'язано, вочевидь, із диференціюванням останнього.

Клітини підлеглої мезенхіми мають негативну реакцію (-) на p63, що співбігає з даними про його експресію лише в недиференційованих епітеліальних клітинах [18,22].

На відміну від попередньої, імуногістохімічна реакція ембріонального епітелію з антионкогеном p53 демонструє негативну реакцію (-), як в

ядрах камбіальних клітинних елементів, та ектокутикули ектодерми, так і мезенхімальних клітинних елементів. Останнє свідчить, вочевидь, про фізіологічність та стабільність клітинної проліферації без ушкодження клітинного геному [5,15].

Відомо, що пухлинний супресор- p53 контролює експресію деяких інгібіторів та стимуляторів пухлинного ангиогенезу, пригнічення його функції призводить до активації ангиогенезу [17]. Дане положення підтвердилось при проведенні реакції ембріонального покривного епітелію шкіри із сироваткою до VEGF- судинного ендотеліального фактора росту [20]. Так відмічена помірно (++) позитивна реакція цитоплазми ендотеліоцитів судинних бруньок мезенхіми, що мали у просвіті ядровмісні еритроцити [4]. Крім того, слабо позитивна (+) реакція відмічена у фібробластів та клітинних елементах ембріонального епітелію. Таким чином, спостерігається взаємний вплив клітин диференціюючої ектодерми і мезенхіми на ангиогенез.

Нарешті, вивчення активності продукта проонкогена bcl-2, відомого як антиапоптотичний фактор, з локалізацією в мембранах мітохондрій [5,15], виявлена слабка його експресія (+) у цитоплазмі клітинних елементів як ембріонального епітелію, так і в підлеглий до нього мезенхімі. Клітини ектокутикули мали як позитивну експресію даного білка, так і негативну, що пов'язано, вочевидь, з ініціацією механізмів апоптозу в останніх.

Ектодерма шкіри ембріонів більш старшого віку (8-12 тижнів) представлена вже псевдобагаторядним епітелієм. При оглядовому забарвленні та гістохімічному дослідженні він має округлі та овальні ядра, розташовані на різних рівнях відносно базальної мембрани, з перпендикулярною орієнтацією до базальної мембрани (вертикальний анізоморфізм) [4]. При цьому дані клітини контактують з останньою. Видовжені ядра інтерфазних клітин розташовані апікально, а округлі - в клітинах з мітозами, переважно знаходяться у профазі циклу, та розташовані більш базально від попередніх. ШИК- позитивне перинуклеарне забарвлення клітинних елементів псевдобагаторядного епітелію свідчить про вміст гранул глікогену, як енергетичного матеріалу, необхідного для підтримання клітинної проліферації [3,10].

Мезенхімальна структура під псевдобагаторядним епітелієм має виражене скупчення проліферуючих клітинних елементів із гіперхромними ядрами і великим вмістом глікогену в перинуклеарній зоні. При цьому міжклітинна речовина з блідою базофілією, вочевидь, за рахунок глікозаміногліканів містить формуючі судини лакунарного типу, та судинні бруньки [21].

Кариометрія псевдобагаторядного епітелію шкіри виявила в ньому п'ять ядерних класів [9]. При цьому, подібно до попередньої групи ембріонів, клітини даного епітелію в інтервалі LgV

ядра 0,55 відповідають базально розташованим камбіальним елементам. Ядра епітелію, що займає проміжне положення і знаходиться на різних стадіях мітотичного циклу [3] знаходяться в інтервалі LgV 0,9. Нарешті, ядерних клас в інтервалі LgV 0,8 відповідний епітелію, котрій знаходиться у стані фізіологічного некрозу та десквамації. Разом з цим на відміну від попередніх, ядерний клас ліпидовмісних інтерфазних клітин знаходиться в межах інтервала LgV 1,05. Окрім цього присутній ядерний клас з LgV 1,02 в клітинах з широким обідком оптично-пустої цитоплазми.

Імуногістохімічне дослідження з використанням маркера базальних, мало диференційованих клітин p63 виявляє внутрішньоядерну реакцію різної інтенсивності у всьому пласті псевдобагаторядного епітелію. При цьому розкривається висока проліферативна активність клітинних елементів і зростання диференціювання в популяції проліферуючих клітин по мірі проходження мітотичного циклу та віддалення від базальної мембрани. При цьому клітини з базальним розташуванням ядер мають виражено позитивну реакцію (+++) на експресію p63. Ядра епітелію проміжного рівня – від помірно позитивної (++) до слабо позитивної (+) реакції. Нарешті ліпидовмісні інтерфазні клітини мають негативну (-) реакцію з маркером p63.

Таким чином, використання маркера p63 підтвердило належність епітелію з базальним розташуванням ядер до недиференційованих (камбіальних) елементів у псевдобагаторядному епітелії. Ліпидовмісні клітини без експресії маркера p63 втрачали безпосередній контакт з базальною мембраною.

Імуногістохімічна реакція псевдобагаторядного епітелію шкіри ембріона з антионкогеном p 53 також демонструвала його негативну реакцію (-) , як в ядрах камбіальних елементів ектодерми ембріонів людини 8-12 тижнів розвитку, так і вище розташованих клітин, а також клітинних елементів мезенхіми як і в попередньому віці ембріона (4-6 тижнів).

Використання маркера VEGF виявило різко виражено-позитивну (+++) експресію даного фактора в цитоплазмі ендотеліоцитів первинних судин мезенхіми, а також слабку позитивну реакцію (+) цитоплазми клітин псевдобагаторядного епітелію і фібробластоподібних клітинних елементів мезенхіми.

Нарешті, відомий як антиапоптотичний маркер Bcl-2 [19] характеризувався помірно-позитивною реакцією усіх епітеліальних елементів ектодерми ембріонів за виключенням поверхневих клітин з явищами десквамації.

### Висновки

1. Внутрішньоядерна експресія p63 клітинами ембріонального епідермісу раннього (4-6 тижнів, та 8-12 тижнів розвитку ембріонів людини) пренатального періоду різної інтенсивно-

сті: найбільша – ближче до підлеглої мезенхіми, що засвідчує високу здатність до проліферації базальноклітинних елементів через активацію внутрішньоядерних структур при незрілій цитоплазмі. Знижується по мірі проходження мітотичних циклів у поверхневих клітинах ( у зв'язку із диференціюванням).

2. Експресія антиапоптотичного фактора bcl-2 в ранньому ембріональному епітелії шкіри слабо позитивна в цитоплазмі як епідермальних, так і мезенхімальних зірчастих клітинах.
3. Імуногістохімічна реакція ядер клітин раннього епідермісу з p53 як двохарового, так і псевдобагаторядного демонструє негативну реакцію, в тому числі і мезенхімальних клітин, що спонукає, вочевидь, до стимуляції ембріонального ангиогенезу.
4. Маркер судинного ендотеліального фактора росту VEGF має слабку експресію в ендотелії судинних бруньок та кутикулярному епітелії, проте його експресія досягає високого рівня в лакунарних судинах псевдобагаторядного епітелію ембріонів. Останнє засвідчує про регулюючий вплив на розвиток та диференціацію раннього епідермісу не тільки амніону, а й підлеглої мезенхіми.

**Перспективи подальших досліджень в даному напрямку.** Планується вивчення органогенезу з похідних ембріонального епітелію: гортані та молочної залози.

#### Література:

1. Автандилов Т.Т., Саниев К.Б. Плоидометрия в повышении качества патогистологической диагностики // Архив патологии. - 2002. - №3. - С.31-32.
2. Автандилов Г.Г. Основы количественной патологической анатомии. - М.: Медицина, 2002. - 240с.
3. Алов И.А. Цитофизиология и патология митоза. - М.: Медицина, 1972. - С.5-65.
4. Афанасьев Ю.И., Юрина Н.А., Котовский Е.Ф. Гистология / Под ред. Ю.И. Афанасьева, Н.А. Юриной. - М.: Медицина, 2002. - С. 91-92, 719-724.
5. Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В. Иммунологические проблемы апоптоза. - М.: Эдиториал УРСС, 2002. - 320 С.
6. Заварзин А.А. Основы сравнительной гистологии. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1985. - С.36-47.
7. Кнорре А.Г. Эмбриональный гистогенез (морфологические очерки) Л.: Медицина, 1971. - 432 с.
8. Копнин Б.П. Структурная организация и биохимическая активность белка p53/B кл. Канцерогенез. Под ред. Заридзе Д.Г. М.мед.-2004. - С.132-142.
9. Ніколенко Д.Є. Зародок молочної залози, як прототип її гермінативної зони у жінки репродуктивного віку. Світ медицини та біології. - Полтава, 2008. - №2. Ч. II. - с 78-82.
10. Пирс М. Гистохимия. - М.: Медицина, 1962. - 962 С.
11. Пэттен Б.М. Эмбриология человека. - М.: Медгиз. - 1959. - С. 20-143.
12. Серов В.В., Шехтер А.Б. Соединительная ткань ( функциональная морфология и общая патология). М.: Медицина. - 1981. - С. 11-159.
13. Хесин Е.А. Размеры ядер и функциональное состояние клеток. М. Медицина, 1967. - С.10-12.
14. Хэм А., Кормак Д. Гистология: Пер. с англ. - М.: Мир, 1983. - Т.2. - С.5-25.
15. Чумаков П.М. Функция гена p53: выбор между жизнью и смертью // Биохимия. - 2000. - №65. - С.34-47.
16. Шпонька І.С., Гриценко П.О., Ковтуненко О.В Імуногістохімічний профіль раків гортані з різним клінічним впливом та ефектом на проведену терапію // Морфологія. - 2007. - Т. I, №2. - С.95-101.
17. Aberrant p53 expression correlates with expression of vascular endothelial growth factor mRNA and interleukin-8 mRNA and neoangiogenesis in nonsmall-cell lung cancer / A. Yuan, C. Yu, K. Luh et al. // J. Clin. Oncol. - 2002. - Vol.4. - P.900-910.
18. Dabbs D.J. Diagnostic immunohistochemistry. - Churhill Livingstone, 2006. - 828 p.
19. Expression of Bcl-2 family proteins in advanced laryngeal squamous cell carcinoma: correlation with response to chemotherapy and organ preservation / D. Trask, G.Wolf, C. Bradf et al. // Laryngoscope. - 2002. - Vol.112, №4. - P. 638-644.
20. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors // Nat. Med. - 2003. - V.9. - P. 669-676.
21. Folkman J. Angiogenesis // Annu. Rev. Med. - 2006. - Vol.57. - P.1-18.
22. Yang A., Mc Keon F. p63 and p73: p53 mimics, menaces and more // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. - 2000. - Vol.1. - P.199-207.

#### Реферат

##### ИММУНОГИСТОХИМИЯ ЭПИДЕРМИСА РАННЕГО ЭМБРИОГИСТОГЕНЕЗА.

Гасюк Ю.А., Ніколенко Д.Є., Гриценко П.А..

**Ключевые слова:** иммуногистохимия, эпидермис, эмбриогистогенез.

Изучен комплексно гистогенез эпидермиса раннего пренатального периода человека. Иммуногистохимически выявлена различная степень экспрессии биомаркеров p63, bcl-2, p53, VEGF в клеточных элементах развивающейся кожи эмбриона. Предполагается регулирующее действие как амниона, так и подлежащей мезенхимы на дифференцировку эмбрионального эпидермиса.

#### Summary

##### IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF EPIDERMIS AT EARLY STAGE OF EMBRYOHISTOGENESIS

Hasiuk Yu.A., Nikolenko D.Ye., Hrytsenko P.A.

**Key words:** immunohistochemical characteristics, epidermis, embryohistogenesis

Special attention was paid to the complex study of human epidermis histogenesis at early prenatal period. Different expression of biomarkers p63, bcl-2, p53, VEGF in cellular elements of embryo developing skin was found out and proved immunohistochemically. It is possible to surmise the regulating action of both amnion and underlying mesenchyme on the differentiating of embryonic epidermis.