

**М.А.Волошин
Т.М.Матвейшина**

Запорізький державний медичний університет

Ключові слова: внутрішньоутробне антигенне навантаження, глотка, лектин, залишки β -D-галактози, спліт-вакцина для профілактики грипу інактивована.

Надійшла: 18.10.2012

Прийнята: 14.11.2012

УДК 612.112.94+577.112]:611.321.08-053.31]:618.4-097

ЩІЛЬНІСТЬ РОЗПОДІЛУ РЕЦЕПТОРІВ ДО ЛЕКТИНУ АРАХІСУ В СТРУКТУРАХ СТІНКИ ГЛОТКИ ЩУРІВ В ПОСТНАТАЛЬНОМУ ПЕРІОДІ ПІСЛЯ ВНУТРІШНЬОУТРОБНОЇ ДІЇ АНТИГЕНА

Дослідження виконано в рамках науково-дослідної роботи «Лектингістохімічна характеристика морфогенезу органів і тканин в ранньому постнатальному періоді в нормі і експерименті» (номер державної реєстрації 0109U003986).

Резюме. В роботі встановлено, що у тварин, які внутрішньоутробно отримали антиген, щільність рецепторів до лектину арахісу на мембрані та в цитоплазмі епітеліоцитів слизової носової частини глотки на першу добу життя менше порівняно з тваринами інтактною групи. Починаючи з третьої доби життя, інтенсивність відкладення бензидинової мітки в цитоплазмі епітеліоцитів верхньої та нижньої стінки носової частини глотки, а також секреті келихоподібних клітин у експериментальних тварин вище, ніж у інтактних. Вміст вуглеводних залишків β -D-галактози в міжклітинній речовині сполучної тканини підслизової основи глотки вище в експериментальних тварин порівняно з інтактними протягом всіх термінів спостереження. Внутрішньоутробне антигенне навантаження призводить до збільшення кількості PNA⁺-лімфоцитів в слизовій глотки.

Морфологія. – 2012. – Т. VI, № 4. – С. 29-34.

© М.А.Волошин, Т.М.Матвейшина, 2012

Voloshin M.A., Matveyshina T.M. Density distribution of receptors for peanut lectin in the structure of wall rats' pharynx in the postnatal period after antenatal antigen influence.

Summary. It was determined that in animals with antenatal antigen influence density peanut lectin receptors on the membrane and in the cytoplasm of epithelial cells mucus layer of the pharynx' nasal part on the first day of life less in comparison intact animals group. Starting from the third day of life, the intensity of deposition benzydyn mark in epithelial cells cytoplasm of the upper and lower walls of the pharynx' nasal part, and the secret of goblet cells in experimental animals is higher than in intact rats. Content carbohydrate residues β -D-galactose in the intercellular substance of submucous connective tissue of the pharynx above in experimental animals compared with intact during all periods of observation. Antenatal antigen influence leads to an increase in PNA⁺-lymphocytes in the mucous layer of the pharynx.

Key words: antenatal antigen influence, pharynx, lectin, residues β -D-galactose, influenza vaccine (split virion, inactivated).

Вступ

Розвиток дитини є результатом складного поєданого впливу на організм багатьох факторів. У випадку виникнення порушень у системі мати-плацента-плід відбувається інфікування плода висхідним шляхом або трансплацентарно. Слабкість первинної імунної відповіді плоду, що сприяє розвитку патологічних станів, пов'язаних з можливим вторинним інфікуванням після народження, переважно викликана внутрішньоутробним антигенним навантаженням будь-яким агентом (Мислицький В.Ф. та співав., 2009). Передчасний вихід імунологічно незрілих Т-лімфоцитів, що містять рецептори до лектину арахісу та міграція їх до різних органів зумовлена саме впливом антигенів на плід під час вагітності (Волошин Н.А. и соавт., 2006; Куш О.Г. и

соавт., 2010). Імунологічно незрілі PNA⁺-Т-лімфоцити в органі здатні впливати на морфогенез навколишніх структур змінюючи темпи розвитку.

Методи лектинової гістохімії дозволяють специфічно виявляти та розділи між собою певні типи клітин завдяки високій чутливості, селективності та інформативності при ідентифікації глікокон'югатів у тканинних структурах та клітинних елементах (Антонюк В.О., 2005). Диференціювати окремі субпопуляції морфологічно та імуногістохімічно однорідних клітин можна завдяки вибірковості зв'язування лектинів зі структурами різних типів клітин (Волошин Н.А. и соавт., 2005).

Функціонально незрілі структури можна виявити за допомогою використання лектину ара-

хісу, рецептори до якого представлені залишками β -D-галактози, в якості селективних гістохімічних маркерів мембран клітин к ранньому постнатальному періоді (Харченко С.В. и соавт., 2009; Сырцов В.К. и соавт., 2011). Рядом робіт описана динаміка розвитку глотки. Але розподіл рецепторів до лектинів в стінці глотки після внутрішньоутробної дії антигена описаний недостатньо.

Мета

Встановити щільність розподілу рецепторів лектину арахісу в структурах стінки глотки щурів в постнатальному періоді після внутрішньоутробної дії антигена.

Матеріали та методи

Об'єктом дослідження було обрано 178 щурів лінії Wistar на 1, 3, 7, 14, 21, 45, 90 добу постнатального життя. Тварини поділені на чотири групи: перша група – інтактні, тваринам другої групи на 18-ту добу датованої вагітності внутрішньоплідно введено антиген, тваринам третьої групи на 18-ту добу датованої вагітності введено антиген у навколоплідні води (Волошин М.А. та співавт., 2010; Волошин М.А. та співавт., 2011). Контролем були тварини четвертої групи, яким на 18-ту добу датованої вагітності введено внутрішньоплідно фізіологічний розчин. Не залежно від способу введення, антенатальне антигенне навантаження впливає на розвиток плода. Плід заковтує до 1/3 об'єму навколоплідних вод за добу. Введення антигену в навколоплідні води призводить до потрапляння його до травного тракту. Отже весь антиген повинен потрапити до шлунково-кишкового тракту плода, тож його дія буде пролонгованою та не трапиться дезінтеграції антигену. В якості антигену було використано спліт-вакцину Ваксігрип для профілактики грипу інактивовану рідку, що містить гемаглютиніни вірусних штамів грипу в сумарній дозі 45 мкг. При роботі з експериментальними тваринами дотримувались міжнародних принципів Хельсінкської декларації Всесвітньої медичної асоціації про гуманне ставлення до тварин та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№1759-VI від 15.12.2009). Матеріал фіксували у рідині Буена. Гістологічну обробку матеріалу проводили стандартним методом. Виявлення вуглеводних залишків β -D-галактози проводили з використанням лектину арахісу (PNA) за стандартною методикою (Луцик А.Д. и соавт., 1989), з використанням стандартних наборів НПВК «ЛектинТест» (м.Львів). Облік результатів реакції з кон'югатами лектинів проводили напівкількісно при імерсійному збільшенні мікроскопа: +++ – темно-коричневе забарвлення, ++ – коричневе забарвлення, + – світло-коричневе забарвлення, - – відсутність реакції.

Результати та їх обговорення

Рецептори до лектину арахісу виявляються на клітинній оболонці та в цитоплазмі епітеліо-

цитів одношарового однорядного та багаторядного епітелію носової частини глотки, секреті келихоподібних клітин, слизу, на клітинній оболонці та в цитоплазмі епітеліоцитів багатшарового незроговілого епітелію ротової частини глотки, в міжклітинній речовині сполучної тканини підслизової основи глотки, а також на мембрані лімфоцитів та макрофагів, а також дендритних клітин. PNA⁺-лімфоцити виявляються серед клітин епітелію та підслизової основи носової та ротової частин глотки. У новонароджених тварин вміст PNA⁺-лімфоцитів серед клітин одношарового однорядного та багаторядного епітелію носової частини глотки, багатшарового незроговілого епітелію ротової частини глотки, а також в підслизовій основі обох частин глотки максимальний та поступово знижується до 90 доби життя. У антигенпреміюваних тварин кількість PNA⁺-лімфоцитів збільшується з першої до 45 доби життя порівняно з тваринами інтактної групи. На 90 добу життя різниця між показниками тварин досліджуваних груп нівелюється.

Найбільша щільність залишків β -D-галактози виявлена в цитоплазмі епітеліоцитів та секреті келихоподібних клітин епітелію носової частини глотки та багатшарового незроговілого епітелію ротової частини (+++). У інтактних тварин динаміка накопичення бензидинової мітки в цитоплазмі епітеліоцитів та секреті келихоподібних клітин епітелію глотки має чітко виражений хвилеподібний характер зі зниженням на 3 добу та підвищенням до 14 доби життя.

В антигенпреміюваних тварин на 1 добу життя кількість вуглеводних залишків β -D-галактози в цитоплазмі епітеліоцитів менше, ніж у інтактних тварин. Вміст їх поступово збільшується до 7 доби життя. Починаючи з 3 доби життя інтенсивність відкладення бензидинової мітки в цитоплазмі епітеліоцитів верхньої та нижньої стінки, а також в секреті келихоподібних клітин вища у експериментальних тварин, порівняно з інтактними.

Щільність рецепторів до лектину арахісу в слизу носової частини глотки зростає протягом перших 14 діб життя (від + до +++) та залишається на цьому рівні до 90 доби життя. Різниця в інтенсивності забарвлення слизу між досліджуваними групами немає (табл. 1).

Динаміка накопичення вуглеводних залишків β -D-галактози в цитоплазмі епітеліоцитів багатшарового незроговілого епітелію ротової частини глотки також має хвилеподібну динаміку, однак різниця інтенсивності забарвлення структур між досліджуваними групами незначна. Інтенсивність забарвлення слизу в носовій частині глотки у тварин всіх досліджуваних груп поступово зростає від першої (світло-коричневе забарвлення) до 14 доби життя (темно-коричневе забарвлення) та залишається на такому рівні до 90 доби постнатального життя включно. Інтен-

сивність забарвлення слизу ротової частини глотки навпаки поступово знижується від темно-коричневого (+++) до коричневого (++) протягом

перших трьох місяців життя у тварин всіх досліджуваних груп, при чому різниці між групами в забарвленні немає (табл. 2).

Таблиця 1
Інтенсивність забарвлення структур верхньої та нижньої стінки носової частини глотки після постановки реакції з лектином арахісу (PNA)

Тканинні структури та клітинні елементи	Групи тварин	Доба після народження та інтенсивність забарвлення							
		1	3	7	14	21	45	90	
Слиз	I	+	++	++	+++	+++	+++	+++	
	II	+	++	++	+++	+++	+++	+++	
	III	+	++	++	+++	+++	+++	+++	
	IV	+	++	++	+++	+++	+++	+++	
Посмугована облямівка	I	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	
	II	±	++	+++	+++	+++	+++	+++	
	III	±	++	+++	+++	+++	+++	+++	
	IV	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	
Цитоплазма епітеліоцитів одношарового однорядного епітелію	I	+++	+	++	++/+++	++/+++	++/+++	++/+++	
	II	+++	++/+	+++	+++	+++	+++	+++	
	III	++	++/+	+++	+++	+++	+++	+++	
	IV	+++	+	++	++/+++	++/+++	++/+++	++/+++	
Цитоплазма епітеліоцитів одношарового багаторядного епітелію	Поверхнєві	I	+++	+/±	++/+	++	++	++	++
		II	+++/++	++/+	++	++/+++	++/+++	++/+++	++/+++
		III	++/+	++/+	++	++/+++	++/+++	++/+++	++/+++
		IV	+++	+/±	++/+	++	++	++	++
	Вставкові	I	+++	+/±	++/+	++	++	++	++
		II	+++/++	++/+	++	++/+++	++/+++	++/+++	++/+++
		III	++/+	++/+	++	++/+++	++/+++	++/+++	++/+++
		IV	+++	+/±	++/+	++	++	++	++
	Базальні	I	+++	+	++	++/+++	++/+++	++/+++	++/+++
		II	+++	++	+++/+++	+++	+++	+++	+++
		III	++	++	+++/+++	+++	+++	+++	+++
		IV	+++	+	++	++/+++	++/+++	++/+++	++/+++
Секрет келихоподібних клітин	I	+++	+	+++	++/+++	++/+++	++/+++	++/+++	
	II	+++	+/+++	+++	+++	+++	+++	+++	
	III	+++	+/+++	+++	+++	+++	+++	+++	
	IV	+++	+	+++	++/+++	++/+++	++/+++	++/+++	
Базальна мембрана	I	-	+	++	+++	+++	++/+++	++/+++	
	II	±	++	+++	+++	+++	+++	+++	
	III	±	++	+++	+++	+++	+++	+++	
	IV	-	+	++	+++	+++	++/+++	++/+++	
Цитоплазма лімфоцитів	I	++	++	++	++	++	++	++	
	II	++	++	++	++	++	++	++	
	III	++	++	++	++	++	++	++	
	IV	++	++	++	++	++	++	++	
Міжклітинна речовина сполучної тканини	I	-	+	++	+++	+++	++/+++	++/+++	
	II	±	++	+++	+++	+++	+++	+++	
	III	±	++	+++	+++	+++	+++	+++	
	IV	-	+	++	+++	+++	++/+++	++/+++	
Волокна	I	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	
	II	+++	++/+++	+++	+++	+++	+++	+++	
	III	++	++/+++	+++	+++	+++	+++	+++	
	IV	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	

Примітка: I – інтактні тварини, II – тварини, яким внутрішньоплідно введено антиген, III – тварини, яким антиген введено в навколоплідні води, IV – контроль.

Інтенсивність забарвлення структур в стінці ротової частини глотки після постановки реакції з лектином арахісу (PNA)

Тканинні структури та клітинні елементи	Групи тварин	Доба після народження та інтенсивність забарвлення							
		1	3	7	14	21	45	90	
Слиз	I	+++	+++	+++	+++	++	++	++	
	II	+++	+++	+++	+++	++	++	++	
	III	+++	+++	+++	+++	++	++	++	
	IV	+++	+++	+++	+++	++	++	++	
Цитоплазма епітеліоцитів багатоядерного незроговілого епітелію	Поверхневий шар	I	+++	++	++	+++	++	++	++
		II	+++	++	++	+++	++	++	++
		III	+++	++	++	+++	++	++	++
		IV	+++	++	++	+++	++	++	++
	Шипуватий шар	I	+++	++	++	+++	++	++	++
		II	+++	++	++	+++	++	++	++
		III	+++	++	++	+++	++	++	++
		IV	+++	++	++	+++	++	++	++
	Базальний шар	I	+++	++	++	+++	++	++	++
		II	+++	++	++	+++	++	++	++
		III	+++	++	++	+++	++	++	++
		IV	+++	++	++	+++	++	++	++
Базальна мембрана	I	±	+	+ / ++	+ / ++	++	++	++	
	II	+	++	++	++	++ / +++	++ / +++	++ / +++	
	III	+	++	++	++	++ / +++	++ / +++	++ / +++	
	IV	±	+	+ / ++	+ / ++	++	++	++	
Цитоплазма лімфоцитів	I	++	++	++	++	++	++	++	
	II	++	++	++	++	++	++	++	
	III	++	++	++	++	++	++	++	
	IV	++	++	++	++	++	++	++	
Міжклітинна речовина сполучної тканини	I	±	+	+ / ++	+ / ++	++	++	++	
	II	+	++	++	++	++ / +++	++ / +++	++ / +++	
	III	+	++	++	++	++ / +++	++ / +++	++ / +++	
	IV	±	+	+ / ++	+ / ++	++	++	++	
Волокна	I	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	
	II	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
	III	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
	IV	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	

Примітка: I – інтактні тварини, II – тварини, яким внутрішньоплідно введено антиген, III – тварини, яким антиген введено в навколоплідні води, IV – контроль.

Вміст вуглеводних залишків β -D-галактози в міжклітинній речовині сполучної тканини підслизової основи глотки поступово збільшується протягом перших 14 днів життя (від - до +++), з подальшим зниженням до 90 доби життя. Описана тенденція більше виражена у тварин експериментальних груп порівняно з інтактними.

У новонароджених тварин, які внутрішньотробно отримали антиген, виявлені зміни динаміки накопичення залишків β -D-галактози в структурах глотки порівняно з тваринами інтактної групи, які зберігаються до 90 доби життя.

Як встановлено раніше, внутрішньотробне введення антигену призводить до прискорення виходу імунологічно незрілих PNA⁺-лімфоцитів із тимусу, що мігрують до стінки глотки, кишки, селезінки, де PNA⁺-лімфоцитів в 2-3 рази більше,

ніж у тварин інтактної групи (Волошин Н.А. і соавт., 2005). Згідно з положеннями концепції «Лімфоцит – фактор морфогенезу» (Волошин Н.А., 2005) PNA⁺-лімфоцити впливають на морфогенез оточуючих клітин, це лежить в основі кількісних та якісних змін клітинного складу епітелію та підслизової основи глотки у експериментальних тварин порівняно з тваринами інтактної групи, що було описано нами раніше (Матвейшина Т.М. та співавт., 2012). На поверхні клітин та волокон накопичуються специфічні глікокон'югати, розподіл яких є відображенням процесу морфогенезу клітин. У процесі дозрівання тканин відзначається тенденція до зменшення глікокон'югатів із кінцевими залишками β -D-галактози, в основі чого найчастіше лежить механізм маскування кінцевих залишків β -D-

галактози сіаловою кислотою (Бернік Н.В. та співавт., 2010). Водночас до складу муцину слизу окрім залишків фукози, N-ацетілглюкозаміну, N-ацетілгалактозаміну та сіалових кислот, входять залишки β -D-галактози. Слиз носової частини глотки секретується не лише келихоподібними клітинами, а й епітеліоцитами. Слиз є одним з механізмів неспецифічного імунного захисту. Тож зменшення вмісту рецепторів до лектину арахісу в цитоплазмі епітеліоцитів, а також зниження вмісту глікозаміногліканів у слизу носової частини глотки антигенпремійованих тварин на першу добу життя може бути свідченням зниження неспецифічного імунного бар'єру.

Підсумок

У тварин, які внутрішньоутробно отримали антиген, щільність рецепторів до лектину арахісу на мембрані та в цитоплазмі епітеліоцитів слизової носової частини глотки на першу добу життя менше порівняно з тваринами інтактної групи. Починаючи з третьої доби життя, інтенсивність

відкладення бензидинової мітки в цитоплазмі епітеліоцитів верхньої та нижньої стінки носової частини глотки, а також секреті келихоподібних клітин у експериментальних тварин вище, ніж у інтактних. Вміст вуглеводних залишків β -D-галактози в міжклітинній речовині сполучної тканини підслизової основи глотки вище у експериментальних тварин порівняно з інтактними протягом усіх термінів спостереження. Внутрішньоутробне антигенне навантаження призводить до збільшення кількості PNA⁺-лімфоцитів в слизовій глотки.

Перспективи подальших досліджень

В подальшому планується вивчити розподіл рецепторів до фукозо- та манозоспецифічних лектинів в структурах стінки глотки після внутрішньоутробного антигенного навантаження, а також дослідити взаємозв'язок між інтенсивністю відкладення бензидинової мітки та кількісними і якісними змінами в стінці глотки шурів.

Літературні джерела

Антонюк В. О. Лектини та їх сировинні джерела / Антонюк В. О. – Львів : Кварт, 2005. – 554 с.

Бернік Н. В. Морфологія людини і лектингістохімія / Н. В. Бернік, І. Ю. Олійник, Л. П. Лаврів // Клінічна та експериментальна патологія. – 2010. – Т. 9, № 3. – С. 138-143.

Внутриутробная антигенная стимуляция как модель для изучения морфогенеза органов / Н. А. Волошин, Е. А. Григорьева, О. Г. Куц [и др.] // Морфологические ведомости. – 2006. – №1-2. – С. 57-59.

Волошин Н. А. Лектины животного и растительного происхождения: роль в процессах морфогенеза (обзор литературы и собственных исследований) / Н. А. Волошин, Е. А. Григорьева // Журнал АМН України. – 2005. – Т. 11, № 2. – С. 223-237.

Волошин Н.А. Лимфоцит – фактор морфогенеза / Н. А. Волошин // Запорожский медицинский журнал. – 2005. – Т. 3, № 30. – С. 122.

Куц О. Г. Методика вивчення популяції γ Д-Т-лімфоцитів із використанням панелі лектинів / О. Г. Куц, М. А. Волошин // Вісник морфології. – 2010. – № 16. – С. 76-81.

Лектин-гистохимическое исследование периферических органов иммунной системы человека в пренатальном периоде онтогенеза / В. К. Сырцов, Е. Г. Алиева, Е. И. Потоцкая [и др.] // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. – 2011. – Т. 24, № 1. – С. 42-44.

Луцик А. Д. Лектины в гистохимии / А. Д. Луцик, Е. С. Детюк, М. Д. Луцик. – Львов : Вища школа, 1989. – 144 с.

Матвейшина Т. М. Особливості розподілу глікозаміногліканів в стінці носової частини глотки шурів в постнатальному періоді в нормі та після внутрішньоутробної дії антигена / Т. М. Матвейшина, М. А. Волошин // Український науково-медичний молодіжний журнал. – 2012. – № 2. – С. 31-35.

Мислицький В. Ф. Взаємозалежність між кількістю імунокомпетентних клітин та системним імунітетом у дітей із внутрішньоутробною або постнатальною інфекціями / В. Ф. Мислицький, Н. В. Гребенюк // Клінічна анатомія та оперативна хірургія. – 2009. – Т. 8, № 3. – С. 41-48.

Пат. 49377 Україна, МПК А 61 Р 37/00. Спосіб моделювання внутрішньоплідної дії антигенів / Волошин М.А., Федотченко А.В., Матвейшина Т.М.; заявник та патентовласник Запорізьк. державн. медичний ун-т. – №u200911825; заявл. 19.11.09; опубл. 26.04.10, Бюл. №8.

Пат. 63020 Україна, МПК G 09 В 23/28. Спосіб моделювання внутрішньоутробної дії антигенів / Волошин М.А., Матвейшина Т.М., Грінівецька Н.В., Бурега Ю.О., Таланова О.С.; заявник та патентовласник Запорізьк. державн. медичний ун-т. – №u 2011 02218; заявл. 25.02.2011; опубл. 26.09.2011, Бюл. №18.

Харченко С. В. Особенности распределения рецепторов лектинов в нормальном эмбриогенезе легких и почек крыс / С. В. Харченко, О. А. Дорохова, Е. Ю. Шаповалова // Український медичний альманах. – 2009. – Т. 12, № 3. – С. 185-188.

Волошин Н.А., Матвейшина Т.Н. Плотность распределения рецепторов к лектину арахиса в структурах стенки глотки крыс в постнатальном периоде после внутриутробного действия антигена

Резюме. В работе показано, что у животных, получивших внутриутробно антиген, плотность рецепторов к лектину арахиса на мембране и в цитоплазме эпителиоцитов слизистой оболочки носовой части глотки на первые сутки жизни меньше по сравнению с животными интактной группы. Начиная с третьих суток жизни, интенсивность отложения бензидиновой метки в цитоплазме эпителиоцитов верхней и нижней стенки носовой части глотки, а также в секрете бокаловидных клеток у экспериментальных животных выше, чем у интактных. Накопление углеводных остатков β -D-галактозы в межклеточном веществе соединительной ткани подслизистой основы глотки выше у экспериментальных животных по сравнению с интактными на протяжении всех сроков наблюдения. Внутриутробная антигенная нагрузка приводит к увеличению количества PNA⁺-лимфоцитов в слизистой оболочке глотки.

Ключевые слова: внутриутробная антигенная нагрузка, глотка, лектин, остатки β -D-галактозы, сплит-вакцина для профилактики гриппа инактивированная.