

А.М.Ященко

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

Ключові слова: лектини, гістотопографія, кардіоембріогенез щура.

Надійшла: 02.04.2013

Прийнята: 23.05.2013

УДК 577.112.85:577.154.5:576.7:611-013.7

ЛЕКТИНОВИЙ ПРОФІЛЬ КЛІТИН СЕРЦЯ ЩУРІВ НА ЕТАПАХ ЕМБРІОНАЛЬНОГО І ПОСТНАТАЛЬНОГО РОЗВИТКУ

Резюме. У роботі досліджено розподіл рецепторів лектинів до WGA, LCA, RCAI, LAL, PSA, PFA, UeA, PNA у серцях ембріонів щурів на етапах ембріонального і раннього постнатального розвитку. З допомогою результатів дослідження гістотопографії лектинів виявлено клітинні популяції ендокарда, міокарда, епікарда та перикарда, а також конденсованої та неконденсованої мезенхіми та проведено додатковий аналіз основних гістогенетичних процесів ембріонального серця щура у контексті впливу фактора часу; встановлено характер набуття дефінітивного стану окремих популяцій клітин та структур ембріонального серця щура, ступінь проліферативних та міграційних процесів в серці зародка, а також наявність та щільність апоптотичних ділянок.

Морфологія. – 2013. – Т. VII, № 2. – С. 90-94.

© А.М.Ященко, 2013

Yashchenko A.M. Lectin profile of rat cardiac cells on the stages of embryonic and postnatal development.

Summary. The distribution of the lectin-receptors for WGA, LCA, RCAI, LAL, PSA, PFA, UeA, PNA in the embryonic hearts of the rat embryos during the stages of embryogenesis and early postnatal ontogenesis was investigated in this work. There were concluded populations of cells from the endocardium, myocardium, epicardium and pericardium, and so condensed and decondensed mesenchyma and conducted the additional analysis of the main histogenetic processes of embryonic rat heart in the context of the impact of the time factor using the results of the researches of lectins histotopography; it was set the nature of the acquisition of the definitive status of individual populations of cells and structures of the embryonic rat heart, the degree of proliferative and migratory processes in the heart of the fetus, as well as the presence and density of apoptotic regions.

Key words: lectins, histotopography, cardioembryogenesis of the rat.

Вступ

Під час нормального кардіоембріогенезу роль та механізми основних міграційних процесів окремих клітинних популяцій підлягають постійному впливу з боку як фактора онтогенетичного часу, так і базових гістогенетичних процесів (Твердохліб І.В., Шпонька І.С., 1998). Сьогодні, використовуючи певні набори лектинів різноманітної вуглеводної специфічності, ми маємо можливість отримати інформацію про перерозподіл вуглеводзалежних молекул в ході онтогенетичного розвитку під впливом фактора віку (Антонюк В.О. та співавт., 2004; Джура О.Р. та співавт., 2006). Завдячуючи вибірковості зв'язування окремих лектинів з різноманітними клітинами, можна диференціювати окремі субпопуляції морфологічно однотипних клітин (Антонюк В.О., 2005).

Вважають, що накопичення специфічних глікокон'югатів на поверхні окремих популяцій клітин зародка віддзеркалює основні процеси сортування та інтеграції клітинного базису, об'єднаного загальними гістологічними потенціями. Нещодавно було доведено, що надлишок галактози перешкоджає міграції ембріональних клітин у щурів (Goswami S. et al., 2003). До того ж відомо, що в процесах клітинної адгезії беруть

участь рецептори лектинів, що мають кінцеві залишки D-галактози та глікокон'югати з N-ацетил-D-галактозаміном (Yamazaki K.G. et al., 2012). Тенденція до зменшення вмісту глікокон'югатів з кінцевими нередукованими залишками D-галактози відмічається за ходом диференціювання ембріональних тканин. В основі цього лежить механізм маскування кінцевих залишків D-галактози сіловою кислотою. Вочевидь, що за характером гістотопографії рецепторів лектинів виникає можливість для з'ясування інтенсивності міграційних процесів та ступеня диференціювання клітин у досліджуваних тканинах (Zlotowski P. et al., 2006).

Метою роботи було визначення специфічної локалізації рецепторів лектинів протягом гістогенетичних перетворень серця щура в пренатальному та ранньому постнатальному онтогенезі.

Матеріали та методи

Серця ембріонів щурів від 12-ї доби гестації до народження, а також матеріал від новонароджених тварин і щурів впродовж 1-го місяця постнатального розвитку фіксували у рідині Буена та заливали у парапласт. Гістологічні зрізи завтовшки 7 мкм інкубували у 3%-ному розчині H₂O₂ з метанолом у співвідношенні 1:2 протягом

10 хвилин для пригнічення дії ендогенної пероксидази. Для блокування неспецифічних сайтів зв'язування лектинів використовували 1%-ний розчин бичачого сироваткового альбуміна (БСА) на 10 мМ забуференому фізіологічному розчині (рН 6,9–7,0) протягом двох годин при температурі +20–22 °С. Потім проводили інкубацію впродовж 10 годин при +4°C з пероксидазними кон'югатами лектинів зародків пшениці (WGA), сім'ян сочевиці (LCA), рицини звичайної (RCAI), кори бобівника анагіролистого (LAL), гороху (PSA), ікри окуня (PFA), сім'ян улекса (UeA) та арахісу (PNA). Активність пероксидази виявляли за допомогою 0,02%-ного розчину 3,3'-діамінобензидина (ДАБ) з 0,021%-ним H₂O₂ у буферному розчині 50 мМ трис-НСІ, рН 7,3–7,4. Забарвлення зупиняли у дистильованій воді. Після ретельного промивання зрізів для видалення надлишку ДАБ здійснювали проводку зрізів через розчини етилового спирту із зростаючою концентрацією, ксилол, і потім заключали в бальзам.

Результати та їх обговорення

На початку 12-ї доби гестації компактний міокард серця щура перебував на етапі формування. Ділянки вrostання судин з боку епікарда визначалися поверхневими клітинними групами міоцитів міокарда шлуночків. Дані ділянки зв'язували незначну кількість лектину арахіса (PNA) при послідовній двоступеневій обробці зрізів серця кон'югатом з біотином та авідином з пероксидазою. Слабопозитивний рівень зв'язування виявлявся серед PNA лектин-зв'язувальних сайтів поверхні мембрани передсердних кардіоміоцитів.

Клітини ендокарда мали негативну реакцію з PNA та позитивну – з лектинами сім'ян сочевиці (LCA) та рицини звичайної (RCAI). Ці результати вказували на відсутність глікокон'югатів з кінцевою β-галактозою та на початок формування бі-, три- та тетраантенних гліканів комплексного типу на поверхні плазматичної мембрани клітин ендокарда. Поряд із лектином LCA до взаємодії із вуглеводними залишками корової частини N-гліканів нами використовувався лектин зародків пшениці (WGA). На даному терміні гестації характерним було скупчення WGA-мітки не лише на поверхні цитомембрани, а й в вуглеводному остові сарколеми кардіоміоцита. Обидві реакції зв'язування даного лектину мали слабкий ступінь.

Протягом дослідження специфічними мембранними локусами цитолемі мезенхімних клітин як конденсованої, так і неконденсованої фракцій на триантенні N-глікани був обраний лектин групи LCA. Найбільш інтенсивний ступінь зв'язування він мав із мембранними вуглеводними детермінантами клітин компактно мезенхіми, особливо серед клітин стовбурової субендокардіальної фракції. Інтенсивність мітки лек-

тину LCA серед неконденсованих мезенхімних клітин була досить рівномірною та помірною у всіх регіонах ембріонального серця. Для рецепторів лектину гороху (PSA) на поверхні мезенхімних клітин спостерігалася більш вагома щільність розподілу, ніж на поверхні сарколеми кардіоміоцитів. Використання цієї групи лектинів підтверджувало спорідненість фукозних корових залишків вуглеводних детермінант мембран досить розрізаних ембріональних клітинних популяцій. При цьому спорідненість фукозних залишків клітин мезенхіми та кардіоміоцитів визначалася лише серед клітин неконденсованої фракції з більш інтенсивним ступенем гістохімічної реакції останньої з лектином гороху. Скупчення LCA-мітки мали місце серед перикардіальних клітин та визначалися поодинокими ділянками забарвлення. Це, ймовірно, свідчило про недостатню проліферативну активність перикардіального регіону ембріонального серця на даному гестаційному терміні.

На 14-у добу ембріогенезу гістохімічне фарбування компактного і трабекулярного міокарда лектином PNA мало певні відмінності. Зокрема, виявлялося послаблене накопичення β-галактози поверхневими глікокон'югатами трабекулярних кардіоміоцитів; поступовий перехід інтенсивності гістохімічної реакції, що виявляли поверхневі вуглеводні ланки кардіоміоцитів губчастого міокарда; інтенсивне зв'язування даного лектину з поверхнею цитолемі кардіоміоцитів компактного міокарда. При цьому продукт гістохімічної реакції мав особливий характер скупчення, в залежності від інтенсивності реакції. Таким чином, у складі компактного міокарда виявлялися поодинокі ділянки з інтенсивним і помірним накопиченням β-галактози, тоді як серед трабекулярних кардіоміоцитів реакція мала вигляд поширених плямоподібних скупчень з розпливчастими та збідненими межами.

Ендокардіальні клітини характеризувалися більш виразним ступенем зв'язування з лектинами LCA та RCAI. При цьому гістохімічна реакція останньої групи спостерігалася серед клітин ендокардіального оточення структурних компонентів конусно-стовбурового відділу ембріонального серця щура. Дані обставини дозволяли припустити початок формування специфічних біантенних N-гліканових комплексів у складі ендотеліальних клітин, що набували певного ступеня диференціювання.

Біантенні N-глікани комплексного типу, що мають значну кількість залишків сіалових кислот, визначалися як лектинами LCA, так і WGA групи. Дані комплекси вуглеводних залишків локалізувалися переважно у позаклітинному матриксі ендокардіальних структур конусно-стовбурового та атріовентрикулярного відділів ембріонального серця. Інтенсивність означеної гістохімічної реакції серед перерахованих стру-

ктур серця була нерівномірною, з переважанням саме у подушках стовбура. Виявлена невідповідність, скоріш за все, є наслідком більшої виразності проліферативних процесів даного відділу серця на даному етапі ембріогенезу.

Період активного синтезу N-ацетил-D-галактозаміна поверхні глікокаліксу клітин мезенхіми визначався максимальним рівнем вмісту лектин-LCA-зв'язувальних сайтів на поверхні цитомембран протягом 14-ї доби кардіоембріогенезу щура. Найінтенсивніший ступінь щільності продукту гістохімічної реакції мав місце серед клітин конденсованої мезенхіми аортопльмонального септаційного комплексу. Мезенхімна популяція атріовентрикулярного каналу мала більш виразну реакцію з лектином PSA. Скупчення PSA-мітки спостерігалось серед кардіоміоцитів шлуночків. За даними гістохімічного дослідження, зменшення зв'язування лектину з кінцевими залишками α -L-фукози вуглеводного шару сарколеми свідчило про значне виснаження клітин у складі міокарда під час його гістогенетичних перебудов, однак при цьому активізувалися процеси впорядкування взаємного розташування кардіоміоцитів. Після інкубації з пероксидазними глікокон'югатами лектину LCA виявлялося специфічне забарвлення перикардіального регіону, як і на попередньому ембріональному терміні. Локуси гістохімічної взаємодії виявлялися у складі поширених та інтенсивно забарвлених ділянок.

На 16-у добу ембріогенезу щурів характер зв'язування лектину PNA в субепікардіальній і субендокардіальній зонах міокарда шлуночків набував нерівномірності. Більш інтенсивного фарбування набувала гістохімічна реакція в ділянках редукції елементів трабекулярного міокарда. Ділянки зв'язування кінцевої β -галактози кардіоміоцитів у лівому шлуночку розповсюджувалися глибше від епікарда та компактного міокарда та мали більшу щільність і поширеність на поверхнях сарколем кардіоміоцитів частково губчастого та трабекулярного міокарда. Субепікардіальна зона характеризувалася рівномірним інтенсивним забарвленням. Кардіоміоцити шлуночків виявляли різноступеневу щільність PNA-позитивних груп у складі інтрамуральної зони шлуночкового міокарда. Таким чином, було встановлено, що скоротливі кардіоміоцити субендокардіальної зони обох шлуночків містили незначну кількість кінцевих послідовностей β -галактози в складі рецепторного апарата. Дослідження вмісту α -L-фукозних залишків у складі поверхневого шару глікокалікса цитолемі клітин ембріонального серця за допомогою лектину UeA показало, що на ранніх стадіях ембріогенезу, а саме до 16-ї доби, означені глікокон'югати були відсутні. Починаючи з третього тижня ембріогенезу продукт гістохімічної реакції з лектином UeA набував помірної щільності серед груп

кардіоміоцитів інтрамуральної, субепікардіальної та субендокардіальної зон міокарда лівого шлуночка. Ділянки реакції мали помірне забарвлення та поширений характер.

Спостерігалось зменшення щільності ділянок зв'язування рицини звичайної та кінцевих нередукованих залишків D-галактози на поверхні клітин ендокарда ембріонального серця щура. При цьому інтенсивність забарвлення продукту реакції зв'язування WGA та вуглеводних детермінант ендокардіоцитів зростала у порівнянні із попереднім терміном. Можливо, що в основі цього явища частіше за все виявляється механізм маскування кінцевих залишків D-галактози сіаловими кислотами. Під час нашого дослідження наявність даного явища антагоністичного прояву RCAI/WGA-мітки визначає остаточні етапи диференціювання ендокардіоцитів ембріонального серця щура на вказаному терміні.

Серед мезенхімних клітин ендокардіальних структур серця мала місце помірна гістохімічна реакція зв'язування лектинів LCA та PSA. В ході дослідження виявилася найбільша щільність скупчення продукту реакції LCA-сайтів та N-гліканів комплексного типу клітин мезенхіми у ділянці септації конусного відділу ембріонального серця. При цьому ступінь виразності даної реакції супроводжували клітинні масиви субендокардіальної мезенхімної фракції та підклапанної гребеневої зони. При вивченні лектину гороху виявилось, що клітинна мембрана мезенхімоцитів накопичує мітку дискретно, в незалежності від популяційної фракційності та особливостей локалізації серед структурних компонентів ембріонального серця. Ймовірність переважання окремих LCA+ ділянок на фоні рівномірності розподілення забарвлення продукту гістохімічної реакції з лектином гороху, скоріше за все, вказує на появу апоптотичних локусів серед мезенхімоцитів.

Протягом 18-ї доби ембріогенезу спостерігалось інтенсивне однорідне забарвлення на кінцеву β -галактозу сарколеми кардіоміоцитів інтрамуральної та субепікардіальної зон міокарда. На відміну від попереднього досліджуваного терміну субендокардіальна зона вирізнялася більшою однорідністю гістохімічної реакції, тоді як субендокардіальна зона міокарда лівого шлуночка мала нерівномірний, але помірної інтенсивності характер зв'язування лектину PNA. Картина гістохімічного забарвлення міокарда шлуночків лектином UeA в інтрамуральній і субепікардіальній зонах міокарда виявлялася помірним ступенем зв'язуванням лектину. Субендокардіальна зона, як і раніше, зберігала незначну реакційну здатність.

Гістохімічна характеристика ендокардіальної популяції клітин ембріонального серця відрізнялася від попередньої стадії більшою щільністю скупчення продукту реакції зв'язування мас-

кованих кінцевих залишків D-галактози клітин ендокарда з лектином WGA та набагато меншою інтенсивністю реакції з лектином рицини звичайної. Це свідчило про набуття дифінітивного стану вуглеводного шару цитомембрани ендокардіоцитів за ступенем реалізації впорядкованості та стабілізації структури тканини.

При послідовній двоступеневій обробці зрізів серця кон'югатом лектину кори бобівника анагіролистного (LAL) з біотином та авідином з пероксидазою виявлялося найщільніше скупчення продукту гістохімічної реакції у товщі стінок новоутворених судин аорти та легеневого стовбура. Звертав на себе увагу рівномірний характер розподілу рецепторів до цього лектину у стінці аорти та неоднорідне розподілення у вигляді радіальних смужок – у стінці легеневого стовбура.

До 20-ї доби гестації в субендокардіальній зоні лівого шлуночка зменшувалась кількість ділянок з помірним вмістом β -галактозних кінцевих залишків глікокон'югатів цитомембран кардіоміоцитів. У порівнянні з попередніми термінами кардіогенезу визначалося послаблене забарвлення локусів скупчення продукту гістохімічної реакції лектину PNA з вуглеводними детермінантами сарколеми кардіоміоцитів інтрамуральної та субепікардіальної зон міокарда.

У новонароджених тварин міокард шлуночків набував рівномірної щільності накопичення продукту реакції зв'язування лектину UeA із кінцевою α -L-фукозою сарколеми кардіоміоцитів. Скоріш за все, причиною цього є участь у реакціях міоцитарно-матриксних взаємодій глікокон'югатів та вуглеводних детермінант мембрани кардіоміоцитів всіх зон міокарда.

Впродовж постнатального онтогенезу при двоступеневій обробці зрізів серця кон'югатом лектину арахіса з біотином та з авідином з визначався рівномірний ступінь гістохімічного забарвлення як у складі шлуночкового міокарда, так і в передсердях. При обробці глікокон'югатами лектину LAL визначалося помірно та рівномірне забарвлення рецепторів як в стінці легеневого стовбура, так і в стінці аорти. При цьому з кон'югатами лектинів ікри окуня (PFA) спостерігалася інтенсивна гістохімічна реакція лише з рецепторами в стінці легеневого стовбу-

ра. Виходячи з даних про специфічність цих лектинів, можливо зробити припущення, що LAL та PFA вказали на характерний розподіл N-гліканів, що мають фукозу в коровій частині молекули.

Наприкінці 3-го тижня ембріогенезу щурів в субендокардіальній зоні міокарда лівого шлуночка з'являлися ділянки з помірним ступенем зв'язування лектину UeA. Субепікардіальна та інтрамуральна зони міокарда набували нерівномірного забарвлення гістохімічної реакції з поодинокими інтенсивними локусами. Впродовж першого місяця постнатального розвитку в серці зрілих щурів ми не спостерігали змін гістохімічної картини розподілення поверхневих глікокон'югатів лектину UeA у шлуночковому міокарді. Накопичення поверхневих α -L-фукозних послідовностей рецепторів передсердних кардіоміоцитів до даного лектину визначалося у помірній кількості аж до першого року життя.

Підсумок

Характер експресії рецепторів лектинів у більшості клітинних популяцій дозволив встановити послідовність етапів гістогенезу ембріонального серця щура. За допомогою лектину арахіса було пошарово охарактеризовано особливості міграційних процесів передсердних та шлуночкових кардіоміоцитів. Встановлено, що чим активніше відбуваються міграційні механізми, тим більша швидкість росту структурованої впорядкованості міокарда спостерігається в досліджуваній проміжок часу. Порядок гістохімічної реакції з лектинами LCA та WGA встановив етапність диференціювання ендокардіоцитів. Аналіз морфогенезу ембріонального серця був доповнений за допомогою результатів зв'язування лектинів LCA, LAL, PFA, PSA. За допомогою лектиногістохімічного аналізу реакції з PSA було встановлено взаємозв'язок із ступенем проліферації конденсованої та неконденсованої мезенхіми ендокардіальних структур ембріонального серця, завдяки яким здійснювались септаційні перебудови.

Перспективи подальших досліджень

Лектиногістохімічна характеристика раннього постнатального онтогенезу серця щура потребує більш детального дослідження з урахуванням походження клітинних субпопуляцій.

Літературні джерела

Антонюк В. О. Лектини та їх сировинні джерела.- Львів: Кварт, 2005.- 180 с.

Антонюк В. О. Порівняльна біохімічна характеристика та селективність зв'язування фукозоспецифічних лектинів ікри окуня (*Persa fluviatilis*L.) і кори золотого дощу звичайного (*Laburnum anagyroides*Medik.) / В. О. Антонюк, А. М. Яценко, О. Д. Луцик // ActaMedica Leopoliensia. - 2004. - Т. 10, № 1. - С. 62-70.

Лектинова гістохімія прищитоподібних залоз осіб чоловічої і жіночої статі у віковому аспекті / О. Р. Джура, А. М. Яценко, В. О. Антонюк [та ін.] // Acta Medica Leopoliensia. – 2006. – Т. 12, № 1. – С. 12-17.

Твердохлеб И. В. Гетерогенность миокарда и ее развитие в нормальном кардиомиогенезе. – Днепропетровск: Пороги, 1996. – 224 с.

Твердохлеб И. В. Стереологические и

лектин-гистохимические характеристики морфогенетических механизмов в сердце млекопитающих / И. В. Твердохлеб, И. С. Шпонька // Укр. мед. альманах. – 1998. - № 3. – С. 131-132.

Cell adhesion molecule mediation of myocardial inflammatory responses associated with ventricular pacing / K. G. Yamazaki, S. H. Ihm, R. L. Thomas [et al.] // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. – 2012. – Vol. 302, № 7. – P. 1387-93.

Combined biochemical and cytological analysis of membrane trafficking using lectins / G. W. Morgan, M. Kail, M. Hollinshead [et al.] // Anal. Bio-

chem. – 2013. – Vol. 26, № 13. – P. 266-2.

Evidence for a role of galactosyl transferase in the process of germ cell migration in rats / S. Goswami, S. Banerjee, S. Bandyopadhyay [et al.] // 19th Annual Meeting of the ESHRE. – Madrid, 2003. – P. 10.

Lectin receptor sites during postnatal osteogenesis in guinea pigs / O. Dzhura, A. Yashchenko, V. Antonyuk [et al.] // Adv. Clin. Exp. Med. – 2012. – Vol. 21, № 1. – P. 19-26.

Lectin-histochemistry: glycogenesis in cattle / P. Zlotowski, E. J. Gimeno, A. Diaz [et al.] // Vet. Res. Commun. – 2006. – Vol. 30, № 4. – P. 369-77.

Яценко А.М. Лектиновый профиль клеток сердца крыс на этапах эмбрионального и постнатального развития.

Резюме. В работе исследовано распределение лектиновых рецепторов к WGA, LCA, RCAI, LAL, PSA, PFA, UeA, PNA в сердцах эмбрионов крыс на этапах эмбрионального и раннего постнатального развития. С помощью результатов исследования гистотопографии лектинов выявлено клеточные популяции эндокарда, миокарда, эпикарда и перикарда, а также конденсированной и неконденсированной мезенхимы и проведено дополнительный анализ основных гистогенетических процессов эмбрионального сердца крысы в контексте влияния фактора времени; установлен характер приобретения дефинитивного состояния отдельных популяций клеток и структур эмбрионального сердца крысы, степень пролиферативных и миграционных процессов в сердце зародыша, а также наличие и плотность апоптотических участков.

Ключевые слова: лектины, гистотопография, кардиоэмбриогенез крысы.