

О.В.Дудок
А.М.Ященко
О.Д.Луцик

Львівський національний
медичний університет
імені Данила Галицького

Ключові слова: Лоратадин, селезінка щура, лектинова гістохімія, дендритні клітини.

Надійшла: 27.02.2016

Прийнята: 14.03.2016

УДК: 611.41-018:547.96]-08:615.218.2

МОРФОЛОГІЧНА ТА ЛЕКТИНОГІСТО-ХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА СЕЛЕЗІНКИ ЗА УМОВ ЗАСТОСУВАННЯ БЛОКАТОРІВ Н1-ГІСТАМІНОВИХ РЕЦЕПТОРІВ У ЕКСПЕРИМЕНТІ

Дослідження проведено в рамках науково-дослідної роботи “Морфологічна та лектиногістохімічна характеристика деяких органів імунного захисту в умовах застосування антигістамінних препаратів” (номер державної реєстрації 0113U000207)

Реферат. Вивчено вплив блокатора Н1-гістамінових рецепторів – Лоратадину – на динаміку мікроструктурних змін у селезінці білих щурів. Встановлено, що пероральне введення терапевтичних доз препарату впродовж 30 днів обумовлює збільшення маси білої пульпи з появою у ній ознак антигенної стимуляції, що проявлялося у появі гермінативних центрів у лімфатичних вузликах, активації у їхньому складі антиген-презентуючих дендритних клітин. Лектини GNA та PNA можуть бути рекомендовані в якості селективних гістохімічних маркерів активованих дендритних клітин селезінки щура.

Morphologia. – 2016. – Т. 10, № 1. – С. 32-37.

© О.В.Дудок, А.М.Ященко, О.Д.Луцик, 2016

✉ Yashchenko_am@ukr.net, Lutsyk@meduniv.lviv.ua

Dudok O.V., Yashchenko A.M., Lutsyk O.D. Morphological and lectin histochemical characteristics of spleen under the experimental application of H1-histamine receptor blockers.

ABSTRACT. Background. It is well known that histamine modulate immunocompetent cells cooperation, since plenty of them expose H- and H2- receptors for this biogenic amine. However, the influence of synthetic blockers of these receptors on the structure and function of the spleen – the immune system organ – remains obscure. **Objective.** To investigate the influence of widely used H1-receptor blocker Loratadine on the microstructure and lectin histochemistry characteristics of a rat spleen. **Methods.** Daily intragastric insertion of Loratadine at a dose of 0.15 mg/kg was maintained for 30 days. Thereafter (on days 10th, 30th of experiment and on days 10th, 20th and 30th after its completion) tissue samples of spleen were excised and subjected to general morphology and lectin histochemistry investigation. **Results.** On the early stages of Loratadine administration it was detected the increased white pulp content. Further changes included the appearance of germinative centers in lymphoid follicles with simultaneous compactization of periarterial zones. Lectin histochemistry revealed the accumulation of dendritic cells, which were selectively labeled by PNA and GNA, while WGA demonstrated its suitability for differential staining of white and red pulp in the rat spleen. **Conclusion.** Prolonged Loratadine administration induce antigenic stimulation of the spleen. Lectins PNA and GNA can be recommended for selective labeling of activated dendritic cells, WGA – for differential staining of white and red pulp of the rat spleen.

Key words: Loratadine, rat spleen, lectin histochemistry, dendritic cells.

Citation:

Dudok OV, Yashchenko AM, Lutsyk OD. [Morphological and lectin histochemical characteristics of spleen under the experimental application of H1-histamine receptor blockers]. Morphologia. 2016;10(1):32-7. Ukrainian.

Вступ

Гістамін відіграє важливу роль у підтриманні гомеостазу у фізіологічних умовах та одночасно є потужним медіатором в алергічних та запальних процесах. Імуномодуляторний ефект гістаміну обумовлений його активним зв'язуванням з Н1- та Н2-рецепторами, які притаманні практично усім імунокомпетентним клітинам [1-3]. Актуальною проблемою сучасної медицини є ріст кількості алергічних захворювань: до 40% дорослого населення і 10-20% дітей потерпають від

різноманітних форм алергії [4]. Внаслідок цього значно зросло застосування у комплексному лікуванні алергій фармакологічних препаратів, спрямованих з одного боку на пригнічення вивільнення гістаміну мастоцитами, а з іншого – на блокаду гістамінових рецепторів клітин-мішеней (зокрема, гладких м'язів мікроциркуляторного русла та стінок дрібних бронхів) [5, 6].

Останнім часом арсенал антигістамінних препаратів значно розширився. Водночас все частіше з'являються повідомлення про неконт-

рольоване застосування цих препаратів при самолікуванні (для їх придбання рецепт лікаря не обов'язковий) чи навіть у якості компонента наркотичних сумішей [7]. При цьому слід врахувати, що поруч із блокадою H1-гістамінових рецепторів клітин, що задіяні у патогенетичній ланці гіперчутливості негайного типу, великою є ймовірність такої ж блокади рецепторів імункомпетентних клітин, у першу чергу тих, що зазнають антигенної стимуляції.

Серед органів імуногенезу важливе місце належить селезінці як органу антиген-залежної диференціації В- і Т-лімфоцитів [8, 9]. Морфофункціональний стан цього органа достатньо добре вивчений при дії чинників різноманітної природи (стрес, голод, гіпергравітація, ксенобіотики) [5, 10-13], у тому числі і з використанням методів лектинової гістохімії [14-17]. Однак у доступній літературі ми не знайшли повідомлень щодо дослідження вуглеводних детермінант структурних компонентів селезінки на тлі систематичного застосування блокаторів гістамінових рецепторів. Цей аспект може представляти практичний інтерес з огляду на важливу роль, яку відіграють глікокон'югати у гістофізіології як в умовах норми, так і в якості чутливих маркерів розвитку патологічних процесів [18-22].

Мета

В експерименті на щурах дослідити вплив тривалого застосування антигістамінного препарату другого покоління Лоратадину стан мікроструктури селезінки та характер перерозподілу її вуглеводних детермінант.

Матеріали та методи

Експерименти виконано на 25 білих щурах-самцях лінії Вістар масою 160-220 г у весняно-літній період. Тварини утримувались у стандартних умовах віварію, на збалансованому харчово-

му раціоні з вільним доступом до води. Усі маніпуляції з тваринами проводили з дотриманням правил "Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та наукових цілей" (Страсбург, 1986) та Закону України "Про захист тварин від жорстокого поводження" (№ 1759-VI від 15.12.2009 р.).

Піддослідних тварин було розділено на дві групи. Перша група (10 тварин) була контрольною. У другій групі (15 тварин) білим щурам щоденно однократно впродовж 30 днів перорально вводили препарат Лоратадин у дозі 0,15 мг/кг маси тіла у вигляді водної суспензії об'ємом 1,0 мл на особину. Лоратадин (Кларитин) – антигістамінний трициклічний препарат другого покоління з пролонгованим механізмом дії (до 24 годин), пов'язаною з вибірковою блокуванням H1-гістамінових рецепторів. Виробник субстанції "FARMACHEM SA Chem Limited" (Індія). Доза застосованого у експерименті препарату відповідає середньодобовій дозі для людини.

Через 10 та 30 днів від початку введення препарату, а також 10, 20 і 30 днів по закінченні введення здійснювали евтаназію тварин шляхом дислокації шийних хребців під загальним ефірним наркозом та забирали проби селезінки для морфологічних досліджень. Отриманий матеріал фіксували у 4% нейтральному формаліні і заливали у парафін за загальноприйнятою методикою. Зрізи товщиною 5-7 мкм забарвлювали гематоксиліном та еозином, а також обробляли лектинами різної вуглеводної специфічності (Табл.1), кон'югованими з пероксидазою. Візуалізацію рецепторів лектинів здійснювали діамінобензидином як описано раніше [18, 23].

Таблиця 1

Характеристика використаних у роботі лектинів*

№	Джерело одержання	Скорочена назва	Вуглеводна специфічність
1.	Лектин арахісу	PNA	β DGal1-3DGalNAc
2.	Лектин виноградного слимака	HPA	α DGalNAc
3.	Лектин бузини чорної	SNA	NeuNAc2-6DGal > DGal
4.	Лектин кори золотого дощу	LABA	α LFuc
5.	Лектин зав'язків пшениці	WGA	DGlcNAc > NeuNAc
6.	Лектин підсніжника	GNA	α DMan
7.	Лектин грузлика димчастого	CNFA	DGalNAc

*Детальніше характеристики і вуглеводна специфічність лектинів представлені у монографії [28].

Мікроскопію проводили в універсальному мікроскопі Leica DM 2500 (Німеччина) з наступним фотографуванням за допомогою цифрової фотокамери Leica DFC450C (Німеччина). За допомогою морфометрії визначали відносну площу білої та червоної пульпи. Застосовували методи-

ку крапкової волюметрії із використанням окулярної морфометричної сітки. Отримані дані обробляли за допомогою програми Statistica 6.1 (StatSoft) для Microsoft Windows 7. Ймовірність похибки — $p < 0,05$ за t-критерієм Стьюдента.

Результати та їх обговорення

При світловій мікроскопії селезінка інтактних щурів мала типову будову, притаманну тваринам цього виду, з чітким поділом паренхіми на червону і білу пульпу (Рис.1А). Остання представлена лімфатичними вузликами з добре вира-

женими центральними артеріями та періартеріальними лімфатичними піхвами,,, червона пульпа складається з тяжів Більота, синусоїдних судин, пеніцилярних артерій та артеріол, а також сполучнотканинної строми.

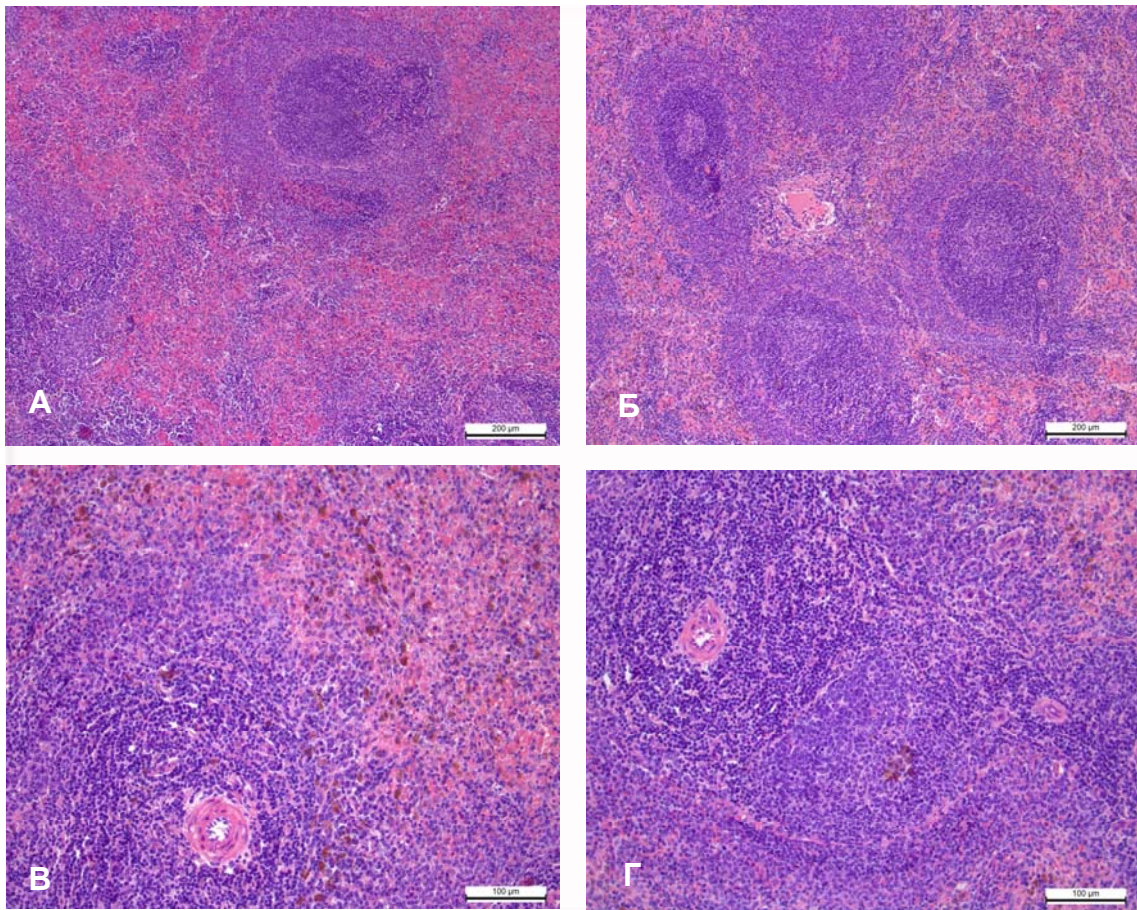


Рис.1. Зміни загальної морфології селезінки щура на тлі введення Лоратадину. А.Селезінка інтактного щура; Б.10-й день дослідження: поява гермінативних центрів у лімфатичних вузликах; В.30-й день дослідження: підвищена щільність лімфоїдних елементів у періартеріальній зоні, розширення тяжів Більота; Г.50-й день дослідження: гіперплазія елементів білої пульпи, відсутність контурів маргінальної зони. Забарвлення гематоксиліном та еозином, $\times 100$ (А, Б), $\times 200$ (В, Г).

При дослідженні селезінки тварин, що отримували Лоратадин протягом 10 днів, виявлено розширення та повнокрів'я окремих синусів червоної пульпи, зростання насиченості строми клітинними елементами, головним чином за рахунок еритроцитів. У складі окремих фолікулів з'явилися нечітко виражені гермінативні центри (Рис.1Б). Виявлені зміни носили фрагментарний характер, що не дає підстав стверджувати про виникнення ознак антигенної стимуляції у цей термін дослідження.

На 30-й день дослідження вищеописані зміни у структурі селезінки поглиблювалися. Зокрема, було виявлено збільшення насиченості білої пульпи клітинними елементами у вигляді локальних і дифузних скупчень лімфоцитів (Рис.1В). Окрім цього, у складі червоної пульпи спостері-

галося наростання вмісту тяжів Більота. У подальші терміни спостереження (40-й, 50-й та 60-й дні експерименту) відмічено зростання маси білої пульпи за рахунок збільшення розмірів лімфатичних вузликів та ущільнення скупчень клітинних елементів періартеріальних зон, міграції лімфоїдних елементів у червону пульпу (Рис.1Г). При цьому площа білої пульпи, особливо на 40-й день, достовірно збільшувалася ($25,72 \pm 0,68\%$) у порівнянні з контрольною групою ($22,48 \pm 0,61\%$). Відповідно меншою була площа червоної пульпи ($74,28 \pm 0,68\%$) проти ($77,52 \pm 0,61$) у інтактних тварин.

Проведені лектиногістохімічні дослідження виявили гетерогенну реактивність структур червоної та білої пульпи. Насамперед, при використанні переважної більшості лектинів привертала

до себе увагу наявність численних гранул у складі червоної пульпи (Рис.2А). Ми пов'язуємо вищезначену неспецифічну реактивність із взаємодією діамінобензидину з дериватом гемоглобіну феритином (останній містить багато просте-

тичних груп $\text{Fe}(\text{OH})_3$, які слугують донором електронів), що підтверджується поставленою нами реакцією *in vitro* взаємодії розчинів діамінобензидину та $\text{Fe}(\text{OH})_3$ за відсутності пероксидази з утворенням осаду коричневого кольору.

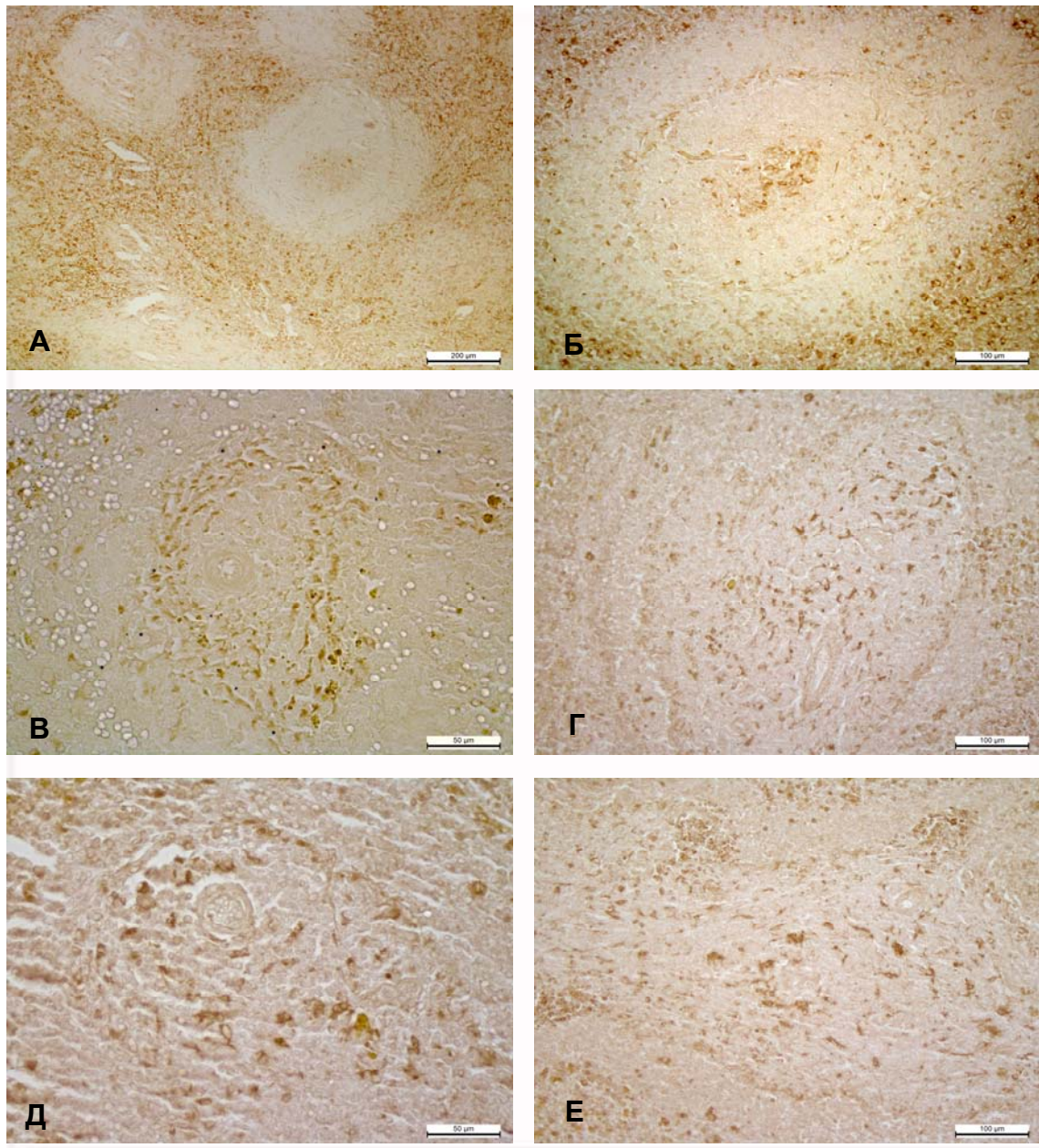


Рис.2. Лектинова гістохімія селезінки щура на тлі введення Лоратадину. А. Контроль, обробка лектином WGA: інтенсивна реактивність червоної пульпи, лімфатичні вузлики ареагивні; Б.30-й день досліді, обробка лектином WGA: скупчення WGA-позитивних клітин у гермінативному центрі лімфатичного вузлика. В.40-й день досліді: накопичення PNA-реактивних дендритних клітин у періартеріальній зоні лімфатичного вузлика; Г, Д, Е.Дендритні клітини, виявлені лектином GNA в складі лімфатичних вузликів селезінки контрольних тварин (Г), на 50-й (Д) та 60-й (Е) дні досліді. $\times 100$ (А), $\times 200$ (Б, Г, Е), $\times 400$ (В, Д).

Лектини SNA та HPA демонстрували низьку спорідненість до структурних компонентів селезінки, натомість лектини PNA, WGA та GNA доволі вибірково взаємодіяли з дендритними клітинами у складі лімфатичних вузликів

(рис.2Б-2Е). При цьому слід зазначити, що введення Лоратадину індукувало зростання числа дендритних клітин на 40-й день експерименту з подальшою стабілізацією цього показника на 50-60-й день.

Візуалізація вищевказаними лектинами антиген-презентуючих дендритних клітин селезінки у піддослідних тварин свідчить про ініціацію імунної відповіді на певні антигени, що узгоджується з даними літератури [16, 24]. Такими антигенами, зокрема, можуть виступати комплекси дериват Лоратадину-ендогенний протеїн, що спонтанно утворюються у печінці – центрі метаболізації ксенобіотиків, про що свідчать дані літератури [25].

Застосування лектину PNA виявило, що введення Лоратадину супроводжується підвищеним експонуванням у складі глікополімерів селезінки термінальних залишків D-галактози, яким належить вагома роль у формуванні та регуляції імунного гомеостазу організму [26]. Експресія таких рецепторів може слугувати певними ознаками антигенної стимуляції.

Зв'язування лектинів PNA та GNA дендритними клітинами свідчить про експонування ними рецепторів з термінальною D-галактозою та D-манозою, які за відсутності антигена, як правило, екрановані залишками сіалових кислот [27]. Останні виявлялися лектином WGA, хоча селективність зв'язування останнього з дендритними клітинами була значно нижчою у порівнянні з лектинами PNA та GNA. Отримані нами дані щодо підвищеного експонування залишків D-галактози та D-манози глікополімерами дендри-

тних клітин селезінки щура співпадають з результатами, отриманими раніше при дослідженні дендритних клітин лімфатичних вузлів морської свинки [17]. Виявлена закономірність, правдоподібно, носить узагальнюючий характер, незважаючи на існування видової чи навіть органної специфічності лектинових рецепторів тих або інших видів клітин [18].

Підсумок

Застосування Лоратадину – блокатора H1-гістамінових рецепторів у експерименті – виявило у селезінці ряд змін, які свідчать про розвиток антигенної стимуляції. Означені зміни торкалися перш за все перерозподілу елементів білої пульпи та появи гермінативних центрів у лімфатичних вузликах, активації у їхньому складі антиген-презентуючих дендритних клітин, що було виявлено методами лектинової гістохімії. Лектини GNA та PNA можуть бути рекомендовані в якості селективних гістохімічних маркерів дендритних клітин селезінки щура. Лектинпероксидазні кон'югати, зокрема, WGA, можна використовувати для диференційного виявлення червоної і білої пульпи селезінки.

Перспективи подальших досліджень полягають у вивченні за допомогою імуногістохімічних методів перерозподілу антигенних детермінант клітинних елементів білої пульпи на тлі Лоратадин-індукованих змін у селезінці.

Літературні джерела References

1. Berezhnaya NM, Kotova SA, Evseeva TA. [Intracellular regulation of the functional state of lymphocyte H1- and H2- receptors in atopy – a possible criterion for individual selection of antihistamines]. *Allergology and Immunology*. 2000;1(1):93-100. Russian.
2. Borisova EO. [Antihistamines: issues of safety]. *Lechebnoe delo*. 2005;(2):37-43. Russian.
3. Shahid M, Tripathi T, Sobia F, Moin S, Siddiqui M, Khan RA. Histamine, histamine receptors and their role in immunomodulation: an updated systematic review. *The Open Immunology Journal* 2009;2:9-41. doi 10.2174/1874226200902010009.
4. Drynov GY, Ulyanova NF, Tyvina NA. [Is allergy a concomitant of the present civilization?]. *Meditsinskaya pomoshch* 2008;1:11-4. Russian.
5. Kashchenko SA, Zolotarevskaya MV. [Morphometric indices of rats' spleen after injection of cyclophosphanum]. *Ukrainskyi morpholohichnyi almanakh*. 2011;9(2):31-3. Russian.
6. Glushchenko AV, Georgiyants VA, Bezz NYu. Development and evaluation of validation characteristics of the quantitative determination method for Loratadine in the syrup. *News of Pharmacy* 2014;1:31-5.
7. Drogovoz SM, Luk'yanchuk VD, Sheyman BS, Kononenko AV. [Toxic effects of H1-histamine receptor blockators and the mechanisms of their formation]. *Modern Problems of Toxicology*. 2012;3-4:44-8. Russian.
8. Cesta MF. Normal function and histology of the spleen. *Toxicol Pathol*. 2006;34(5):455-65.
9. Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol*. 2005 Aug;5(8):606-16.
10. Bulko IV. [Morphological changes in rat spleen in later stages after skin burn and use of lacto-protein with sorbitol]. *Galician Medical Journal*. 2015;22(3, Pt 1):36-8. Ukrainian.
11. Kushkevych MV, Vlizlo VV. [Cellular prion localization and activity of Na⁺-K⁺ and Ca²⁺-ATPases in the spleen of different ages rats]. *The Animal Biology*. 2013;15(2):81-9. Ukrainian.
12. Moroz GA. [Lectinohistochemical characteristic of lymphocytes of the white pulp of the spleen in experimental hypergravity]. *Klinichna anatomiya ta operatyvna khirurgiya*. 2011;10(4):69-73. Russian.
13. Rykalo NA, Huminska OYu, Terekhovska OI. [Peculiarities of morphological structure of immature rats' spleen on the background of chronic drug-induced hepatitis]. *Visnyk naukovykh doslidz-*

hen. 2013;3:95-6. Ukrainian.

14. Voloshyn VM. [Effects of Echinacea tincture and thiotriazolin on histomorphometric indices of spleen of rats exposed to the inhalation of toluene]. *Ukrainskyi morpholohichnyi almanakh*. 2011;9(3):59-61. Ukrainian.

15. Voloshyn MA, Talanova AS. [Distribution of glycoproteins in structures of spleen being in normal condition and after antigen's antenatal effect]. *Galician Medical Journal*. 2013;20(1, Pt 2):17-9. Ukrainian.

16. Kusch AG. [Lectins in immunomorphology]. *World of Medicine and Biology* 2014;(4, Pt 2):150-7. Ukrainian.

17. Yashchenko AM, Antonyuk VO, Nako-nechna OV et al. [Cytotopography of lectin receptors in the structural components of immune system organs]. *Acta Medica Leopoliensia* 2005;11(3):96-100. Ukrainian.

18. Lutsyk AD, Detiuk ES, Lutsyk MD. [Lectins in histochemistry]. Lviv: Vyshcha shkola; 1989. 144 p. Russian.

19. Sharon N. Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. *J Biol Chem*. 2007 Feb 2;282(5):2753-64.

20. Gabius HJ. The sugar code. *Fundamentals of glycosciences*. Wiley-Blackwell; 2009. p. 317-28.

21. Roth J. Lectins for histochemical demonstration of glycans. *Histochem Cell Biol*. 2011 Aug;136(2):117-30. doi: 10.1007/s00418-011-0848-5.

22. Dan X, Liu W, Ng TB. Development and

applications of lectins as biological tools in biomedical research. *Med Res Rev*. 2016 Mar;36(2):221-47. doi: 10.1002/med.21363.

23. Lutsyk A, Ambarova N, Antonyuk V. Diabetic alteration versus postnatal maturation of rat kidney glycoconjugates: comparative detection by lectin probes. *Folia Histochem Cytobiol*. 2013;51(1):92-102. doi: 10.5603/FHC.2013.0013.

24. Zhang M, Tang H, Guo Z, An H, Zhu X, Song W, Guo J, Huang X, Chen T, Wang J, Cao X. Splenic stroma drives mature dendritic cells to differentiate into regulatory dendritic cells. *Nat Immunol*. 2004 Nov;5(11):1124-33.

25. Ivashkin VT, Nepomnyaschykh GI, Aydagulova SV, Nepomnyaschykh DL, Dyubanova GA, Domnikova NP, Migus'kina YeI. [Drug-induced lesion of the liver: general-purpose morphological markers]. *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*. 2009;12(2):20-9. Russian.

26. Dam TK, Brewer CF. Effects of clustered epitopes in multivalent ligand receptor interaction. *Biochemistry*. 2008 Aug 19;47(33):8470-6. doi: 10.1021/bi801208b.

27. Kato M, Neil TK, Fearnley DB, McLellan AD, Vuckovic S, Hart DN. Expression of multilectin receptors and comparative FITC-dextran uptake by human dendritic cells. *Int Immunol*. 2000 Nov;12(11):1511-9.

28. Antonyuk VO. *Lectyny ta yikh syrovynni dzherela* [Lectins and the sources of raw materials]. Lviv: Kvant; 2005. 554 p. Ukrainian.

Дудок О.В., Ященко А.М., Луцки А.Д. Морфологическая и лектиногистохимическая характеристика селезенки в условиях применения блокаторов H1-рецепторов в эксперименте.

Реферат. Изучено влияние блокатора H1-рецепторов – Лоратадина – на динамику микроструктурных изменений в селезенке белых крыс. Установлено, что пероральное введение терапевтических доз препарата в течение 30 дней приводит к увеличению массы белой пульпы с появлением в ней признаков антигенной стимуляции, что проявлялось образованием герминативных центров в лимфоидных фолликулах, активацией в их составе антиген-экспонирующих дендритных клеток. Лектины PNA и GNA могут быть рекомендованы в качестве селективных гистохимических маркеров активированных дендритных клеток селезенки крысы.

Ключевые слова: Лоратадин, селезенка крысы, лектиновая гистохимия, дендритные клетки.