

© Мороз Г.А., 2011

УДК 576.3/7:591.147.3:599.323.41:533.6.013.8

ЛЕКТИНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИМФОЦИТОВ БЕЛОЙ ПУЛЬПЫ СЕЛЕЗЕНКИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРГРАВИТАЦИИ

Г.А.Мороз

Кафедра нормальной анатомии (зав. – проф. В.С.Пикалюк) Крымского государственного медицинского университета им. С.И.Георгиевского, г. Симферополь

ЛЕКТИНОГИСТОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЛІМФОЦИТІВ БІЛОЇ ПУЛЬПИ СЕЛЕЗІНКИ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ГІПЕРГРАВІТАЦІЇ

Резюме. Вивчені особливості розподілу рецепторів лектинів PNA, RCA і WGA в лімфоцитах селезінки щурів, яких упродовж 10, 30 і 45 днів піддавали систематичній дії (10 хв) гравітаційних перевантажень (9 g). Установлено, що гравітаційні перевантаження помітно впливають на морфофункціональний стан лімфоцитів селезінки, змінюють їх адгезивні та міграційні властивості. Вплив гравітаційних перевантажень на Т-залежну зону виявляється після 30-разової дії і характеризується зниженням адгезивних та міграційних властивостей лімфоцитів. Після 45 сеансів гіпергравітації ці зміни досягають максимуму. У В-зонах селезінки найбільші зміни системи адгезія-міграція спостерігаються лише після 45-разової дії гіпергравітації. У маргінальній зоні аналогічні зміни властивостей лімфоцитів виявляються після 30-разової дії перевантажень.

Ключові слова: морфологія селезінки щура, лектини, гіпергравітація.

В настоящее время особый интерес представляют вопросы реактивности организма на воздействие экстремальных факторов высотного и космического полета, одним из которых являются гравитационные перегрузки. Известно, что выраженность защитных реакций организма на внешние воздействия во многом зависит от морфофункционального состояния периферических органов иммуногенеза и, в частности, селезенки (Сз), играющей важную роль в обеспечении естественной резистентности [1, 2]. В последние годы появились публикации, доказывающие, что ключевую роль в процессах морфогенеза играют углеводные остатки, входящие в состав гликопротеинов клетки и обеспечивающие межклеточные и клеточно-матриксные взаимодействия. Изменение углеводного компонента мембранного и цитоплазматического рецепторного аппарата клеток может привести к необратимым морфофункциональным нарушениям [3, 4]. Не являются исключением и клетки иммунных органов. Изучение процессов гликозилирования и выяснение причин их нарушения позволяет судить не только о морфологии и степени дифференцировки им-

мунокомпетентных клеток, но и об уровне их функциональной активности и способности к миграции, а значит и о иммунологической резистентности организма в целом [5-7]. Однако в научной литературе отсутствуют данные об особенностях гистотопографии рецепторов лектинов в лимфоцитах (Лф) Сз при гипергравитационном воздействии.

Цель исследования: изучить экспрессию гликополимеров – рецепторов лектинов на поверхности и в цитоплазме Лф белой пульпы Сз при систематическом воздействии гравитационных перегрузок.

Материал и методы. Исследование проведено на 36 крысах-самцах линии Вистар (с исходной массой 260-280 г). Изучали изменение состава и локализации отдельных углеводных детерминант на клеточных мембранах и в цитоплазме Лф разных морфофункциональных зон белой пульпы Сз (лимфатические периартериальные влагаллица – ЛПАВ, герминативные центры лимфатических узелков – ГЦ, маргинальная зона – МЗ). Животные в зависимости от длительности эксперимента (10, 30 и 45 дней) были разделены на три серии опытов по

12 крыс в каждой (6 – контроль, 6 – эксперимент). Экспериментальных крыс подвергали ежедневному 10-минутному воздействию гравитационных перегрузок величиной 9 g. Гипергравитация моделировалась путем вращения животных в периферических контейнерах центрифуги Ц-2/500. Эксперимент и забой крыс был выполнен с соблюдением действующих биоэтических норм.

Забор материала и приготовление гистологических препаратов выполняли согласно общепринятым методикам работы с лимфоидными органами. Готовили серийные срезы толщиной 4-6 мкм. Обзорные препараты окрашивали гематоксилином и эозином. Гликополимеры Лф выявляли путем обработки срезов лектинами: арахиса (PNA), специфичного к β -D-галактозе; клещевины (RCA), специфичного к β -D-галактозе, экранированной сиаловой кислотой; зародышей пшеницы (WGA), специфичного к N-ацетилнейраминовой кислоте и в меньшей степени – к N-ацетил-D-глюкозамину, конъюгированных с пероксидазой хрена. Препараты обрабатывали с применением стандартных наборов НПК "Лектинотест" (Украина) в разведении лектина 1:50 по известной методике [8]. Визуализацию мест связывания лектина проводили в системе "диаминобензидин – перекись водорода". Контроль специфичности реакции осуществляли путем исключения из схемы обработки препаратов диаминобензидина. Интенсивность окрашивания срезов различными лектинами (отложение бензидиновой метки) оценивали полуколичественным методом в баллах: 0 баллов – отсутствие реакции, 1 балл – слабая реакция, 2 – умеренная реакция, 3 – сильная реакция, 4 – очень сильная реакция.

Результаты исследований и их анализ. У контрольных животных 10-дневной серии опытов Лф ЛПАВ экспрессировали умеренное ко-

личество сайтов связывания лектина арахиса на цитолемме и малое в цитоплазме, что свидетельствовало о их невысоких адгезивных возможностях. Миграционные способности Лф были большими. Сиалированные гликополимеры, являющиеся рецепторами лектинов клещевины и зародышей пшеницы, одинаково умеренно синтезировались в цитоплазме клеток. На цитолемме бензидиновая метка была заметно ярче. Лф ГЦ лимфатических узелков также характеризовались слабыми адгезивными свойствами. После обработки срезов лектином арахиса в цитоплазме клеток определяли лишь следы бензидиновой метки, а на цитолемме таких рецепторов экспрессировалось умеренное количество. Сиалоконъюгатов – рецепторов лектина клещевины выявляли больше. Они присутствовали в большом количестве на цитолемме и в умеренном в цитоплазме Лф. Сиалоконъюгатов – рецепторов лектина зародышей пшеницы экспрессировалось еще больше. Мест связывания этого лектина было очень много на цитолемме клеток и много в их цитоплазме. В МЗ Лф обладали слабой способностью к адгезии. Рецепторов лектина арахиса выявляли мало в их цитоплазме и умеренное количество на цитолемме. Миграционные возможности клеток были несколько выше. Рецепторы лектинов клещевины и зародышей пшеницы умеренно присутствовали в цитоплазме Лф и несколько в большем количестве на их цитолемме (табл. 1).

10-кратное воздействие гипергравитации не изменяло адгезивные свойства Лф ЛПАВ. При этом миграционные возможности клеток возрастали, что проявлялось присутствием очень большого количества рецепторов лектинов клещевины и зародышей пшеницы на цитолемме Т-лимфоцитов. Также высоким было содержание данных биополимеров и в цитоплазме клеток. В Лф ГЦ узелков изменения

Таблица 1

Экспрессия (в баллах) рецепторов лектинов в лимфоцитах белой пульпы селезенки крыс (10-дневный эксперимент)

Лектин	Локализация рецепторов	Контроль			Эксперимент		
		ЛПАВ	ГЦ	МЗ	ЛПАВ	ГЦ	МЗ
PNA	цитолемма	2	2	2	2	2	3
	цитоплазма	1	1	1	1	1	2
RCA	цитолемма	3	3	3	4	3	4
	цитоплазма	2	2	2	3	2	3
WGA	цитолемма	3	4	3	4	4	4
	цитоплазма	2	3	2	3	3	3

спектра биополимерных молекул с углеводными детерминантами не выявляли. Адгезивные и миграционные способности клеток сохранялись на уровне контроля. В свою очередь, в МЗ эти свойства Лф, в сравнении с контрольными данными, увеличивались в разной мере. Так, количество рецепторов лектина арахиса становилось умеренным в цитоплазме клеток и высоким на их цитолемме, а количество рецепторов лектинов клещевины и зародышей пшеницы увеличилось более резко и становилось очень большими на цитолемме Лф и большим в их цитоплазме.

В контроле 30-дневной серии опытов Лф ЛПАВ проявляли умеренные адгезивные и миграционные потенции, что подтверждалось высокой концентрацией рецепторов лектинов арахиса и клещевины на их цитолемме и умеренной в цитоплазме. Сиалоконъюгаты – рецепторы лектина зародышей пшеницы присутствовали в умеренном количестве на цитолемме клеток и в малом в цитоплазме. В ГЦ Лф демонстрировали невысокие адгезивные свойства. Рецепторов лектина арахиса на цитолемме клеток выявляли умеренное количество, а в цитоплазме их содержалось мало. При этом способность Лф к миграции была максимально высокой. Сиалоконъюгатов – рецепторов лектинов клещевины и зародышей пшеницы выявляли очень много на цитолемме клеток и несколько меньше в цитоплазме. В МЗ адгезивные возможности Лф представлялись умеренными. РНА-положительные макромолекулы в большой концентрации располагались на цитолемме клеток, но в цитоплазме их содержалось умеренное количество. Миграционные свойства у Лф этой зоны были очень высокими. На цитолемме клеток выявляли очень много рецепторов лектинов арахиса и зародышей пшеницы, в цитоплазме их содержалось несколько меньше (табл. 2).

После 30-дневного систематического воз-

действия гипергравитации адгезивные и миграционные способности Лф ЛПАВ, в сравнении с контролем, не изменялись и оставались примерно одинаково умеренными. Это касалось экспрессии рецепторов лектинов арахиса и клещевины. Вместе с тем, увеличивалось присутствие мест связывания лектина зародышей пшеницы. Их количество становилось умеренным в цитоплазме клеток и высоким на цитолемме. В ГЦ узелков равновесная система адгезия-миграция в Лф сдвигалась за счет значительного снижения их миграционных возможностей. Количество рецепторов лектина арахиса в сравнении с контролем не изменялось, а содержание рецепторов лектина клещевины снижалось до большого на цитолемме и умеренного в цитоплазме. Количество рецепторов лектина зародышей пшеницы в Лф резко уменьшалось и становилось умеренным на их цитолемме и малым в цитоплазме. В Лф МЗ содержание рецепторов лектина арахиса, клещевины и зародышей пшеницы становилось одинаково умеренным на цитолемме, а в цитоплазме обнаруживали лишь следы бензидиновой метки. Такое снижение экспрессии изученных лектинов свидетельствовало об ослаблении адгезивных и миграционных свойств Лф этой зоны пульпы.

У контрольных крыс 45-дневной серии опытов Лф ЛПАВ проявляли равные адгезивные и миграционные возможности. Выявляли одинаково высокую экспрессию рецепторов лектинов арахиса, клещевины и зародышей пшеницы на цитолемме клеток и умеренную в их цитоплазме. Лимфоциты ГЦ демонстрировали малую способность к адгезии. Галактозаминконъюгаты присутствовали в умеренных количествах на цитолемме клеток, а в цитоплазме такие молекулы встречались редко. Сиалоконъюгаты, функция которых связана с миграцион-

Таблица 2

Экспрессия (в баллах) рецепторов лектинов в лимфоцитах белой пульпы селезенки крыс (30-дневный эксперимент)

Лектин	Локализация рецепторов	Контроль			Эксперимент		
		ЛПАВ	ГЦ	МЗ	ЛПАВ	ГЦ	МЗ
PNA	цитолемма	3	2	3	3	2	2
	цитоплазма	2	1	2	2	1	1
RCA	цитолемма	2	3	4	3	3	2
	цитоплазма	2	4	3	2	2	1
WGA	цитолемма	2	4	4	3	2	3
	цитоплазма	1	3	3	2	1	2

Экспрессия (в баллах) рецепторов лектинов в лимфоцитах белой пульпы селезенки крыс (45-дневный эксперимент)

Лектин	Локализация рецепторов	Контроль			Эксперимент		
		ЛПАВ	ГЦ	МЗ	ЛПАВ	ГЦ	МЗ
PNA	цитолемма	3	2	1	1	1	3
	цитоплазма	2	1	0	0	0	2
RCA	цитолемма	3	3	3	1	1	1
	цитоплазма	2	1	2	0	0	0
WGA	цитолемма	3	2	3	1	0	1
	цитоплазма	2	1	2	0	0	0

ными свойствами клеток, содержались в малом количестве в цитоплазме Лф, на цитолемме их было несколько больше. Вместе с тем, рецепторов лектина клешевины на цитолемме Лф выявляли много, а в цитоплазме – несколько меньше. Лф МЗ проявляли очень слабые адгезивные способности. Галактозаминоконъюгаты в цитоплазме этих клеток отсутствовали, а на цитолемме яркость бензидиновой метки была минимальной. После обработки срезов лектинами клешевины и зародышей пшеницы на цитолемме Лф обнаруживали яркую бензидиновую метку. В цитоплазме клеток реакция была умеренной (табл. 3).

После 45-дневного систематического воздействия гипергравитации изученные потенциалы Лф ЛПАВ резко снижались, что подтверждалось минимальным содержанием, вплоть до полного исчезновения, в клетках рецепторов всех примененных лектинов. В ГЦ лимфатических узелков адгезивные и миграционные свойства Лф также уменьшались. Рецепторов лектинов арахиса и клешевины становилось очень мало на цитолемме Лф, а в цитоплазме они полностью редуцировались. Рецепторов лектина зародышей пшеницы не выявлено. В МЗ адгезивные и миграционные потенциалы Лф также заметно изменялись. Способность клеток к адгезии увеличивалась и становилась умеренной. Рецепторы лектина арахиса на цитолемме Лф экспрессировались в больших количествах. В цитоплазме клеток таких рецепторов содержалось умеренное количество. Миграционные свойства Лф, наоборот, резко уменьшались. На цитолемме клеток рецепторов лектинов клешевины и зародышей пшеницы было очень мало, а в цитоплазме они совсем отсутствовали.

Таким образом, анализ распределения рецепторов лектинов в Лф белой пульпы Сз крыс

зрелого возраста показал, что 10-кратное воздействие гипергравитации слабо влияет на равновесную систему адгезия-миграция Т-лимфоцитов. Способность к адгезии невысокая и не изменяется по сравнению с контролем. Миграционные свойства Т-лимфоцитов при этом увеличиваются. У Лф ГЦ лимфатических узелков адгезивные и миграционные свойства не изменяются. В свою очередь, в МЗ возможности Лф к адгезии и миграции возрастают. 30-кратное воздействие гравитационных перегрузок также практически не изменяет адгезивные свойства Т-лимфоцитов ЛПАВ. В то же время, их миграционные возможности увеличиваются и становятся умеренными. В свою очередь в ГЦ узелков у Лф при сохранении на уровне контроля адгезивных свойств миграционные способности снижаются и становятся слабыми. Наибольшие изменения свойств Лф происходят в МЗ Сз, где уменьшаются как адгезивные, так и миграционные свойства клеток. При 45-кратном воздействии гравитационных перегрузок адгезия и миграция Т-лимфоцитов ЛПАВ резко уменьшаются в сравнении с контролем и становятся очень слабыми. Аналогичное снижение потенциалов Лф происходит и в ГЦ лимфатических узелков, где рецепторы лектина WGA совсем редуцируются на цитолемме и в цитоплазме клеток. Вместе с тем, в МЗ способность Лф к адгезии возрастает.

Выводы и перспективы дальнейших исследований. 1. Стрессорное воздействие систематических гравитационных перегрузок оказывает заметное влияние на морфофункциональное состояние лимфоцитов селезенки крыс, изменяя их адгезивные и миграционные свойства. 2. Влияние гравитационных перегрузок на Т-зависимую зону заметно проявляется после 30-кратного воздействия и характеризуется

снижением адгезивных и миграционных способностей лимфоцитов. После 45 сеансов гипергравитации эти изменения достигает своего максимума. 3. В В-зонах селезенки наибольшие изменения системы адгезия-миграция наблюдаются только после 45-кратного действия гипергравитации. В маргинальной зоне аналогичные

изменения свойств лимфоцитов проявляются раньше – после 30-кратного влияния перегрузок. 4. В дальнейшем целесообразно проведение лектиногистохимических исследований селезенки крыс разного возраста, подвергавшихся систематическому воздействию гравитационных перегрузок.

Литература

1. Григоренко Д.Е. Лимфоидная ткань селезенки крыс в отдаленный период после действия гипергравитации / Д.Е.Григоренко, И.Б.Краснов, М.Р.Сапин // *Вестн. нов. мед. технол.* – 2004. – Т. 11, № 1-2. – С. 21-22.
2. Cesta M.F. Normal structure, function and histology of the spleen / M.F.Cesta // *Toxicologic Pathology*. – 2006. – № 34. – P. 455-465.
3. Волошин Н.А. Использование методов лектиновой гистохимии в морфологии / Н.А.Волошин, Е.А.Григорьева, М.А.Довбыш // *Таврич. мед.-биол. вестн.* – 2004. – Т. 7, № 4, ч. 1. – С. 40-41.
4. Куц О.Г. Методика вивчення популяції $\gamma\delta$ -Т-лімфоцитів з використанням панелі лектинів / О.Г.Куц, М.А.Волошин // *Вісн. морфол.* – 2010. – Т. 16, № 1. – С. 76-80.
5. Цитотопографія рецепторів лектинів у структурних компонентах органів імуногенезу / А.М.Яценко, В.О.Антонюк, О.В.Наконечна [та ін.] // *Львів. мед. часопис.* – 2005. – Т. 11, № 3. – С. 96-100.
6. Sasseti C. Identification of Podocalyxin-like protein as a high endothelial venule ligand for L-selectin: parallels to CD 34 / C.Sasseti, K.Tangemann, M.S.Singer // *J. Exp. Med.* – 1998. – Vol. 187, № 12. – P. 1965-1975.
7. Steinman R.M. Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs / R.M.Steinman, M.Pack, K.Inaba // *Immunol. Rev.* – 1997. – Vol. 156. – P. 25-37.
8. Луцук А.Д. Лектины в гистохимии / А.Д.Луцук, Е.С.Детюк, М.Д.Луцук. – Львов: Вища школа, 1989. – 140 с.

ЛЕКТИНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИМФОЦИТОВ БЕЛОЙ ПУЛЬПЫ СЕЛЕЗЕНКИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРГРАВИТАЦИИ

Резюме. Изучены особенности распределения рецепторов лектинов PNA, RCA и WGA в лимфоцитах селезенки крыс, которых в течение 10, 30 и 45 дней подвергали систематическому воздействию (10 мин) гравитационных перегрузок (9 g). Гравитационные перегрузки заметно влияют на морфофункциональное состояние лимфоцитов селезенки, изменяют их адгезивные и миграционные свойства. Влияние гравитационных перегрузок на Т-зависимую зону определяется после 30-кратного воздействия и характеризуется снижением адгезивных и миграционных свойств лимфоцитов. После 45 сеансов гипергравитации эти изменения достигают максимума. У В-зонах селезенки наибольшие изменения системы адгезия-миграция наблюдаются лишь после 45-кратного воздействия гипергравитации. В маргинальной зоне аналогичные изменения свойств лимфоцитов определяются после 30-кратного воздействия перегрузок.

Ключевые слова: морфология селезенки крысы, лектины, гипергравитация.

LECTINOHISTOCHEMICAL CHARACTERISTIC OF LYMPHOCYTES OF THE THE WHITE PULP OF THE SPLEEN IN EXPERIMENTAL HYPERGRAVITY

Abstract. The specific characteristic of the distribution of the receptors of lectins PNA, RCA and WGA in the spleen lymphocytes of rats subjected to a systematic action (10 min) of gravitational overloads (9 g) during 10, 30 and 45 days have been studied. Gravitational overloads have been found to influence appreciably on the morphofunctional condition of the splenic lymphocytes, changing their adhesive and migration properties. The effect of gravitational overloads on the T-dependent zone reveals itself after a 30-fold action and is characterized by a decrease of the adhesive and migration properties of lymphocytes. After 45 sessions of hypergravitation these changes reach the maximum value. The most appreciable changes of the adhesion-migration system in the B-zones of the spleen are observed only after a 45-fold action of hypergravitation. In the marginal zone similar changes of the lymphocytic properties declare themselves after a 30-fold action of overloads.

Key words: rat spleen morphology, lectins, hypergravity.

Crimean State Medical University named after S.I.Georgiievskiy (Simferopol)

Надійшла 24.10.2011 р.

Рецензент – проф. К.С.Волков (Тернопіль)