

УДК 616.342 – 018.6:613.36.001.5

К.В. Шепітько

Українська медична стоматологічна академія, м. Полтава

ДОСЛІДЖЕННЯ СТУПЕНЯ ЗВ'ЯЗУВАННЯ ЛЕКТИНІВ У СЛИЗОВІЙ ОБОЛОНЦІ ДВАНАДЦЯТИПАЛОЇ КИШКИ ПРИ ВВЕДЕННІ КРІОКОНСЕРВОВАНОЇ ПЛАЦЕНТИ НА ТЛІ ГОСТРОГО АСЕПТИЧНОГО ЗАПАЛЕННЯ ОЧЕРЕВИНИ У ЩУРІВ

Резюме. Аналіз маркування слизової оболонки дванадцятипалої кишки комплексом лектинів встановив, що галактозоспецифічний лектин НРА на відміну від інших виявив посилення експресії від 50% до 100% на 7-14 добу дослідження, що свідчить про активізацію процесів секретотворення в клітинах системи “ворсинка-крипта” в II групі тварин. PFA маркер є вибірконим для оцінки цілісності апікальної поверхні ворсинок, якості слизової секреції келихоподібними клітинами у ворсинках і криптах слизової оболонки стінки дванадцятипалої кишки, а лектин (LSA) – лише в криптах. Зміни експресії рецепторів сіалоспецифічних лектинів WGA, SNA є маркерами відновлення захисної функції слизової оболонки дванадцятипалої кишки за рахунок посилення вироблення слизу, про що свідчить майже 100% експресія келихоподібних клітин в системі “ворсинка-крипта” II групи. Також встановлено відновлення реакції клітин Панета до лектину WGA на рівні 75%, як і в групі інтактних тварин, що свідчить про підтримання адекватного антибактеріального захисту в криптах і системи в цілому.

Ключові слова: маркування, лектини, дванадцятипала кишка, корекція, кріоконсервована плацента, запалення.

Запалення тонкої кишки, зокрема дванадцятипалої, за даними дослідників [1, 2] посідає друге місце від усіх хвороб шлунково-кишкового тракту та з однаковою частотою виявляється у людей обох статей і всіх вікових категорій. Одним з перспективних напрямів у лікуванні дуоденітів є застосування клітинної терапії [3]. Але в літературі ми не виявили достатніх експериментальних обґрунтувань доцільності застосування клітинної терапії при корекції запальних процесів, що і було підґрунтям для проведення даного дослідження [4].

Одним з методів для виявлення реакції структурних компонентів слизової оболонки є застосування вуглеводозв'язувальних білків – лектинів [5-7]. Нині доведений ефект зміни глікокон'югатів на поверхні і в цитоплазмі клітин у процесі їх диференціювання та органної спеціалізації при різних патологічних станах [8]. Більшість асоційованих із запаленням антигенів є вуглеводовмісні біополімери [9].

Основний механізм дії лектинів полягає у їх можливості специфічно зв'язуватися з глікокон'югатами на поверхні клітин, що обумовлює міжклітинні взаємодії при утворенні різних біоло-

гічних спільнот [10].

Мета дослідження: дослідження ступеня зв'язування лектинів з структурними компонентами стінки дванадцятипалої кишки у щурів при введенні кріоконсервованої плаценти на тлі гострого експериментального асептичного запалення очеревини.

Матеріали і методи. Об'єктом експериментального дослідження була стінка дванадцятипалої кишки, яка вилучена від 50 статевозрілих щурів-самців лінії “Вістар”. Експеримент був проведений згідно “Правил використання лабораторних експериментальних тварин” (2006, додаток 4) і Гельсінської декларацією про гуманне ставлення до тварин.

Тварини були розподілені на дві групи: I група – інтактні тварини (5), II група – 45 тварин, яким на тлі гострого асептичного запалення черевної порожнини, викликаного внутрішньоочеревинним введенням λ -карагену, одноразово підшкірно була введена кріоконсервована плацента (медичний імунологічний препарат “Платекс-плацентарний”, сертифікат про державну реєстрацію № 73408-30020000 від 09 липня 2008 року).

Тварин виводили з експерименту шляхом пе-

редозування тіопенталового наркозу. Фрагменти дванадцятипалої кишки вміщували в парафін за загальноприйнятою методикою та виготовляли з них гістологічні зрізи, які забарвлювали: гематоксилін та еозином і виконували лектинохімічні реакції.

За допомогою підібраної панелі лектинів –

HPA, LCA, PFA, PNA, SBA, SWA, WGA нами проведено визначення вуглеводних детермінантклітинних поверхонь стінки дванадцятипалої кишки на різних термінах експерименту, на яких найбільш виражені були порушення структури (за даними гістологічного і морфометричного досліджень) (1, 7, 14 доби експерименту) (табл. 1).

Таблиця 1

Спектр лектинів, використаний для вивчення структурних компонентів дванадцятипалої кишки

Лектин	Скорочена назва	Джерело отримання	Вуглеводна специфічність
Лектин виноградного слимака	HPA	Helix pomatia	α GalNAc
Лектин арахісу	PNA	Arachis hypogaea	β Gal
Лектин насіння сої	SBA	Glycine max	α GalNAc
Лектин ікри окуня	PFA	Laburnum anagyroideum	α LFuc
Лектин сочевиці	LCA	Lens culinaris	α Man
Лектин бузини чорної	SNA	Sambucus nigra	α NeuNAc
Лектин зародків пшениці	WGA	Triticum vulgare	β GlcNAc > α NeuNAc

Примітка. GalNAc – N-ацетил-галактозамін; Gal – галактоза; Glc – глюкоза; Fuc – фукоза; Man – маноза; NeuNAc – N-ацетилнейрамінова (сіалова) кислота; GlcNAc – N-ацетил-глюкозамін.

Інтенсивність лектиногістохімічної реакції визначалась від світло- до темно-коричневого кольору. Інтенсивність забарвлення оцінювали напівкількісним методом за наступними критеріями: 0 балів – відсутність реакції, 1 бал – слабка реакція, 2 бали – помірна реакція, 3 бали – сильна реакція, 4 бали – різка реакція.

Використовували мікроскоп *bioex 3* (серійний номер 5604) з цифровою мікрофотонасадкою фірми DCM 900.

Результати досліджень та їх обговорення. Дослідження ступеня зв'язування (маркування) галактозоспецифічного лектину HPA з рецепторами клітин кишкових ворсинок та крипт (ентероцити, келихоподібні клітини) дванадцятипалої кишки показало, що маркування в I групі (інтактних) тварин було на рівні 75%, а експресія клітин Панета становила 100%.

У II групі тварин на 1 добу нами встановлено, що ступінь зв'язування цього лектину з глікокон'югатами на поверхні клітин у ворсинах не встановлений, а в криптах становив 50%. На 7 добу в клітинах ворсинок ступінь експресії становив у межах 75%, в криптах ентероцитів без облямівки забарвлювався на 75%, в келихоподібних клітинах – на 50%, в клітинах Панета – на 100%. На 14-у добу ступінь зв'язування в ворсинах показав, що експресія в ентероцитах з облямівкою становила 75%, а в келихоподібних клітинах – 100%. У криптах на цей термін реакція зв'язування ентероцитів без облямівки і келихоподібних клітин була на рівні 75%, а в клітинах Панета

– на рівні 100%.

Отже ступінь маркування галактозоспецифічного лектину HPA показав, що на 14-ту добу дослідження ступінь експресії порівнявся з показниками інтактної групи.

Аналізуючи ступінь зв'язування галактозоспецифічного лектину PNA в групі інтактних тварин, нами було виявлено краще маркування ентероцитів з облямівкою (75%) в ворсинках і в келихоподібних клітинах (табл. 2).

У II групі тварин на 1-у добу дослідження, в ворсинках виявлено помірну реакцію ентероцитів з облямівкою і келихоподібних клітин, що становило 50%. У криптах не виявлялась реакція ентероцитів і келихоподібних клітин. У цей же час у клітинах Панета виявилось маркування на рівні 50%. На 7-у добу в ворсинках ступінь зв'язування становив 75%, а в криптах цей показник виявився тільки в клітинах Панета на рівні 100%. Аналіз цього показника на 14-у добу не показав відмінностей від попереднього терміну дослідження.

Отже ступінь зв'язування лектину PNA виявив, що на 7-у добу всі показники клітин, за винятком келихоподібних клітин, дорівнював показникам групи інтактних тварин.

Аналіз ступеня взаємодії рецепторів з галактозоспецифічним лектином SBA в інтактній групі показав сильний ступінь зв'язування з келихоподібними клітинами на рівні 75% та клітинами Панета на рівні 100% тільки в криптах.

Ступінь зв'язування цього лектину у ворсинках встановлений на 1-у добу на 75%, 7-14-ті доби

– 25%. У криптах виявили реакцію лише в клітинах Панета: на 1 добу 25%, на 7-14-у добу 100% (див. табл. 2).

Отже взаємодії рецепторів з галактозоспеци-

фічним лектином SBA в II групі тварин виявив, що на 7 добу реакція в келихоподібних клітинах та клітинах Панета дорівнювала ступеню реакцій в групі інтактних тварин.

Таблиця 2

Ступінь зв'язування галактозоспецифічних лектинів

Лектин			Ворсинка		Крипта		
			Ентероцит з облям.	Келихоподібні клітини	Ентероцит без облям.	Келихоподібні клітини	Клітини Панета
HPA	Інтакт		3	3	3	3	4
	Плац і запа.	1 д.	0	0	2	2	2
		7 д.	3	3	3	2	4
		14 д.	3	4	3	3	4
PNA	Інтакт		3	2	2	3	2
	Плац і запа.	1 д.	2	2	0	0	2
		7 д.	3	3	0	0	4
		14 д.	3	3	0	0	3
SBA	Інтакт		0	1	0	3	4
	Плац і запа.	1 д.	0	3	0	0	1
		7 д.	0	1	0	0	4
		14 д.	0	1	0	0	4

Аналіз маркування фукозоспецифічним лектином PFA клітин слизової оболонки дванадцятипалої кишки в інтактній групі показав, що як у ворсинках, так і в криптах ентероцитів зв'язувались цим лектином на 75%, келихоподібні клітини – на 50% і клітини Панета – на 75%.

У II групі тварин ентероцити ворсинок упродовж 1-14-ї доби зв'язувались на 75%, у келихоподібних клітинах на 1 добу ступінь маркування становив 0%, а на 7-14-ї добу – 50%. Клітини крипт у II групі впродовж усіх термінів дослідження не зв'язувались з цим лектином (0%).

Отже маркування фукозоспецифічним лектином PFA на 7-ї добу дослідження показало експресію клітин в ворсинках порівняно з групою інтактних тварин.

Дослідження ступеня зв'язування манозоспецифічного лектину (LCA) з рецепторами клітин кишкових ворсинок та крипт слизової оболонки дванадцятипалої кишки показало, що маркування в групі інтактних тварин було неоднакове. Так, в ворсинках ентероцитів з облямівкою промаркувались на рівні 100%, келихоподібні клітини зовсім не вступили в реакцію. В криптах ентероцити без облямівки реагували на 25%, в келихоподібних клітинах – на 75%, в клітинах Панета – на 50%.

Аналіз ступеня маркування в II групі показав, що на 1-14-ту добу дослідження в ворсинках реакція зв'язування була відсутня. Слід відзначити, що у криптах клітини Панета не прореагували з лектином LCA, а ентероцити без облямівки, келихоподібні клітини на 7-14-у добу відреагували на

рівні 50% та 75% відповідно (табл. 3).

Отже ступінь реакції манозоспецифічного лектину LCA виявив, що реакція цього лектину на 7-14 добу дослідження дорівнював показникам інтактної групи.

Результати дослідження ступеня зв'язування сіалоспецифічного лектину SNA з глікокаліксом рецепторів клітин ворсинок та крипт дванадцятипалої кишки наведені в таблиці 4.

В інтактній групі тварин маркування слизової оболонки ворсинок і крипт знаходилось в межах 25-75%.

Аналізуючи ступінь маркування ворсинок і крипт II групи показав, що показник маркування ентероцитів з облямівкою в ворсинках на 1 добу знаходився на рівні 50%, а на 7-14-ту добу він знизився на 25%. Келихоподібні клітини впродовж всіх термінів дослідження зберігали сталу експресію на лектин SNA на рівні 75%. У криптах упродовж 7-14-ту доби звертало на себе увагу маркування келихоподібних клітин на рівні 50%.

У клітинах ворсинок і крипт слизової оболонки дванадцятипалої кишки при дії сіалоспецифічного лектину (WGA) в інтактній групі тварин маркування виявлено на рівні 100% в келихоподібних клітинах, в ворсинках, криптах та клітинах Панета – на рівні 75%.

Дослідження ступеня зв'язування клітин, які знаходяться у ворсинках і криптах II групи, нами виявлені наступні зміни: на 1-14-ту добу дослідження на 100% лектин WGA зв'язувався з глікокаліксом келихоподібних клітин ворсинок. У кри-

Таблиця 3

Ступінь зв'язування фукозо- і манозоспецифічних лектинів

Лектин			Ворсинка		Крипта		
			Ентероцити з облям.	Келихоподібні клітини	Ентероцит без облям.	Келихоподібні Клітини	Клітини Панета
PFA	Інтакт		3	2	2	2	3
	Плац і запа.	1 д.	3	0	0	0	0
		7 д.	3	2	0	0	0
		14 д.	3	2	0	0	0
LCA	Інтакт		4	0	1	3	2
	Плац і запа.	1 д.	0	0	0	0	0
		7 д.	0	0	2	3	0
		14 д.	0	0	2	3	0

Таблиця 4

Ступінь зв'язування сіалоспецифічних лектинів

Лектин			Ворсинка		Крипта		
			Ентероцит з облям.	Келихоподібні клітини	Ентероцит без облям.	Келихоподібні клітини	Клітини Панета
SNA	Інтакт		1	3	1	2	3
	Плац і запа.	1 д.	2	3	0	0	0
		7 д.	1	3	0	2	0
		14 д.	1	3	0	2	0
WGA	Інтакт		0	4	0	4	3
	Плац і запа.	1 д.	0	4	1	3	3
		7 д.	0	4	0	3	3
		14 д.	0	4	0	4	3

птах на 1-7-у добу дослідження келихоподібні клітини відреагували на 75%, а на 14-у добу – на 100%. Вивчаючи антибактеріальний захист кишки, а саме клітин Панета, які розташовані в крипті, нами виявлено, що рівень експресії на всіх термінах був однаковий (75%).

Висновки. 1. Аналіз маркування слизової оболонки дванадцятипалої кишки комплексом лектинів встановив, що галактозоспецифічний лектин PFA на відміну від інших виявив посилення експресії від 50% до 100% на 7-14-у добу дослідження, що свідчить про активізацію процесів секретотворення в клітинах системи “ворсинка-крипта” в II групі тварин. 2. PFA маркер є вибірковою для оцінки цілісності апікальної поверхні ворсинки, якості слизової секреції келихоподібними клітинами у ворсинках і криптах слизової оболонки стінки дванадцятипалої кишки, а лек-

тин (LCA) – лише в криптах. 3. Зміни експресії рецепторів сіалоспецифічних лектинів WGA, SNA є маркерами відновлення захисної функції слизової оболонки дванадцятипалої кишки за рахунок посилення вироблення слизу, про що свідчить майже 100% експресія келихоподібних клітин в системі “ворсинка-крипта” II групи. Також, встановлено відновлення реакції клітин Панета до лектину WGA на рівні 75%, як і в групі інтактних тварин, що свідчить про підтримання адекватного антибактеріального захисту в криптах і системи в цілому.

Перспективи подальших досліджень. У подальшому планується вивчити зміни вуглеводної специфічності, які відбуваються в порожній кишці при введенні плацентарної тканини на тлі гострого асептичного експериментального запалення очеревини.

Список використаної літератури

1. Зинovieв А.С. Хроническое воспаление слизистых оболочек: интеграция иммунитета и регенерация / А.С. Зинovieв, А.В. Кононов // *Арх. патол.* – 1997. – Т. 59, № 2. – С. 18-24.
2. Мазурин А.В. Актуальные вопросы лечения язвенной болезни двенадцатиперстной кишки у детей / А.В. Мазурин // *Педиатрия.* – 1991. – № 1. – С. 32-35.
3. Грищенко В.И. Трансплантация продуктов эмбриофетоплацентарного

комплекса. От понимания механизма действия к повышению эффективности применения / В.И. Гриценко, А.Н. Гольцев // *Ж. проблемы криобиологии*. – 2002. – № 1. – С. 54-84. 4. Кріоконсервована плацента вплив на перебіг експериментального сіададеніту / [Шенітько В.І., Єрошенко Г.А., Юрченко Т.М. та ін.]. – Полтава: Копирсервис, 2013. – 122 с. 5. Коваленко Е.О. Позаклітинні лектини бактерій роду *Bacillus*: автореф. дис. на здобуття наукового ступеня докт. біолог. наук. / Е.О. Коваленко – К., 1999. – 36 с. 6. Луцик М.Д. Лектини / М.Д. Луцик, Е.Н. Панасюк, А.Д. Луцик. – Львов: Вища школа, 1981. – 152 с. 7. Arato A. Crypt hyperplasia related to increased lymphocyte activation in the rectal mucosa of children with ulcerative colitis / A. Arato, E. Savilahti, I. Paszti // *Zeitschrift fur Gastroenterologie*. – 1994. – № 9. – P. 483-487. 8. Dennis J.W. Glycoprotein glycosylation and cancer progression / J.W. Dennis, M. Granovsky, C.E. Warren // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1999. – Vol. 1473, № 1. – P. 21-34. 9. Sharon N. Lectins / Sharon N., Lis H. – Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. – 440 p. 10. Lis H. Lectins: carbohydrate specific proteins that mediate cellular recognition / H. Lis, N. Sharon // *Chem. Rev.* – 1998. – Vol. 98. – P. 637-674.

ИССЛЕДОВАНИЕ СТЕПЕНИ СВЯЗЫВАНИЯ ЛЕКТИНА В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ДВЕНАДАТИПЕРСТНОЙ КИШКИ ПРИ ВВЕДЕНИИ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ ПЛАЦЕНТЫ НА ФОНЕ ОСТРОГО АСЕПТИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ БРЮШИНЫ У КРЫС

Резюме. Анализ зондирования слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки комплексом лектинов установил, что галактозоспецифический лектин HPA в отличие от других обнаружил усиление экспрессии от 50% до 100% на 7-14-е сутки исследования, что свидетельствует об активизации процессов секретобразования в клетках системы “ворсинка-крипта” во II группе животных. PFA маркер является выборочным для оценки целостности апикальной поверхности ворсинок, качества образования слизистого секрета бокаловидными клетками в ворсинках и криптах слизистой оболочки стенки двенадцатиперстной кишки, а лектин (LSA) – только в криптах. Изменения экспрессии рецепторов сиалоспецифических лектинов WGA, SNA являются маркерами восстановления защитной функции слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки за счет усиления выработки слизи, о чем свидетельствует почти 100% экспрессия бокаловидных клеток в системе “ворсинка-крипта” в II группе. Также, установлено реакции восстановления клеток Панета к лектину WGA на уровне 75%, как и в группе интактных животных, что свидетельствует о поддержании адекватной антибактериальной защиты в криптах и системе в целом.

Ключевые слова: зондирование, лектины, двенадцатиперстная кишка, коррекция, криоконсервированная плацента, воспаление.

STUDY OF LECTIN BINDING DEGREE IN THE DUODENAL MUCOSA UNDER ADMINISTRATION OF CRYOPRESERVED PLACENTA AGAINST THE GROUND OF ACUTE ASEPTIC PERITONEAL INFLAMMATION IN RATS

Abstract. Analysis of duodenal mucosa probing with the complex of lectins has detected that galactose-specific lectin HPA unlike others has found increased expression from 50% to 100% on 7-14 days of research which is indicative of the activation of cells secreting processes of the “villus-crypt” system in the II group of animals. PFA is a selective marker to assess the integrity of the apical surface of the villus, quality of mucous secretion by goblet cells in the villus and crypt of the mucous membrane of the duodenal wall, and lectin (LSA) – only in the crypt. Changes in receptor expression of sial-specific lectins WGA, SNA are markers to restore protective function of the duodenum mucosa due to increased mucus production, as evidenced by almost 100% of goblet cells expression in the “villus-crypt” system in the II group. Also, Paneth cell repair to lectin WGA reactions is detected on the level of 75%, as in the group of intact animals, which is indicative of maintaining adequate antimicrobial protection in the crypt and the system as a whole.

Key words: probing, lectins, duodenum, correction, cryopreserved placenta inflammation.

I. Ya. Horbachevskiy Ternopil State Medical University (Ternopil)

Надійшла 02.02.2015 р.
Рецензент – проф. Давиденко І.С. (Чернівці)