

УДК 611.311.2-018-053.1-097.1

М.А. Волошин, Ю.О. Бурега*

*Кафедра анатомії людини, оперативної хірургії та топографічної анатомії (зав. – проф. М.А. Волошин), *кафедра пропедевтичної та хірургічної стоматології (зав. – доц. С.О. Чертов) Запорізький державний медичний університет*

ОСОБЛИВОСТІ РОЗПОДІЛУ ВУГЛЕВОДНИХ ЗАЛИШКІВ β -D-ГАЛАКТОЗИ В ЕПІТЕЛІЇ СЛИЗОВОЇ ЯСЕН ЩУРІВ У НОРМІ ТА ПІСЛЯ ВНУТРІШНЬОУТРОБНОГО АНТИГЕННОГО ВПЛИВУ

Резюме. Метою роботи було визначення особливостей розподілу вуглеводних залишків β -D-галактози в епітелії слизової ясен щурів в нормі та після внутрішньоутробного антигенного впливу. У новонароджених вакцинпреміюваних тварин змінюється лектингістохімічна характеристика епітелію слизової ясен. Щільність розподілу β -D-галактозоспецифічних рецепторів епітелію слизової ясен залежить від віку досліджуваних щурів і певного шару епітелію слизової ясен. У антигенпреміюваних тварин з 1-ї до 7-ї доби життя спостерігається збільшення щільності PNA+ сполук, що вказує на компенсаторне зменшення щільності лектингісторецепторного бар'єра і може бути підґрунтям для виникнення порушень у гермінативній зоні епітелію ясен. З 14-ї доби і до закінчення експерименту в епітелії ясен усіх досліджуваних груп виявляється зниження кількості рецепторів до лектину арахісу, що є відображенням компенсаторних можливостей щодо відновлення лектингісторецепторного бар'єру для забезпечення здатності епітелію реалізовувати захисну функцію від механічного та антигенного впливів.

Ключові слова: антиген, щури, ясна, внутрішньоутробний період.

Лектини – це великий клас білків, що мають загальну властивість обернено і вибірково зв'язувати вуглеводи і вуглеводні детермінанти біополімерів без зміни їх ковалентної структури [1]. Лектинова гістохімія на даний час є перспективним напрямком у вивченні закономірностей гістогенезу і визначенні функціонального стану різних компонентів тканин [2]. Основними перевагами методу лектинової гістохімії, у порівнянні з традиційними гістологічними методиками, є висока чутливість, селективність та інформативність в ідентифікації глікокон'югатів у клітинах і тканинах [3]. Глікани є молекулярними епітопами, які можуть бути функціонально активними за рахунок того, що вони синтезуються комплексним ензиматичним апаратом з формуванням окремих варіантів, експресія яких суворо контролюється та забезпечує доступність для взаємодії на поверхні клітини [4]. Розгляд гліканів, як молекул-носіїв інформації, призводить до інтерпретації гліканових епітопів в якості сигналів, що втілюються в концепції вуглеводного коду [5, 6]. Вуглеводні ланцюги глікопротеїнів та глікофінголідів представлені різноманітними молекулами, які беруть участь у чисельних клітинних функціях, зокрема розпізнавання клітин, адгезію та сигналізацію [7]. Інфор-

мація, закодована у вуглеводних ланцюгах, може бути розшифрована за допомогою молекулярних інструментів, наприклад лектинів та селектинів [6, 8]. Дані сучасної спеціальної літератури з питань розподілу рецепторів до лектинів в епітелії ясен у нормі та після антигенного впливу в антенатальному періоді на сьогодні відсутні.

Мета дослідження: встановити особливості розподілу вуглеводних залишків β -D-галактози в епітелії слизової ясен щурів у нормі та після внутрішньоутробного антигенного впливу.

Матеріал і методи. Об'єктом дослідження стали 224 щелепи 112 білих лабораторних щурів. Тварини були розділені на 3 групи: 1 група – інтактні щури, 2 група – щури, яким на 18-ту добу внутрішньоутробного розвитку введено 0,05 мл розчину антигену в навколоплідні води, 3 група – контрольна, тваринам якої на 18-ту добу внутрішньоутробного розвитку виконано навколоплідне введення 0,9% розчину хлориду натрію. Для вивчення особливостей морфогенезу слизової ясен та лімфоїдної тканини, асоційованої зі слизовою ясен, на тлі дії антигену на плід, обрано модель черезматкового черезоболонкового введення антигену в навколоплідні води за методом М.А. Волошина (2011). В якості антигену було обрано

© Волошин М.А., Бурега Ю.О., 2016

спліт-вакцину Vaxigrip для профілактики грипу, інактивовану, рідку. Забій тварин здійснювали на 1-шу, 5-ту, 7-му, 11-ту, 14-ту, 30-ту, 45-ту добу постнатального життя шляхом декапітації під глибоким ефірним наркозом.

Виявлення вуглеводних залишків β -D-галактози (Gal) проводили за допомогою постановки лектингістохімічної реакції із застосуванням лектинів арахісу (PNA), використовуючи стандартні набори лектинів НБК "Лектинтест" (м. Львів). Візуалізацію ділянок зв'язування лектинів проводили у системі діамінобензидин-перекис водню. Інтенсивність відкладення бензидинової мітки оцінювали напівкількісно: 4 у.о. – дуже сильна реакція (темно-коричневий колір), 3 у.о. – сильна реакція (коричневий колір), 2 у.о. – помірна реакція (жовто-коричневий колір), 1 у.о. – слабка реакція (світло-коричневий колір), 0 – відсутність реакції. Проміжні відтінки кольорів оцінювались відповідно: 1,5 у.о., 0,5 у.о. тощо. Збільшення мікроскопа (ок. 10x, об. 100x).

Результати досліджень та їх обговорення.

В епітелії слизової ясен новонароджених щурів інтактною та контрольної групи розподіл PNA+ речовин є нерівномірним відносно епітеліальних шарів. Найвища щільність залишків β -D-галактози для даного терміну спостерігається в цитоплазмі та на мембранах клітин зернистого шару, що візуалізується як близьке до коричневого забарвлення. Епітеліоцити шипуватого шару накопичують бензидинову мітку менш активно. Колір забарвлення – світло-коричневий. Клітини базального шару визначаються як найменш PNA-позитивні, їх забарвлення блідо-коричневе. У новонароджених антигенпреміюваних тварин збільшення експресії спостерігається в шипуватому та зернистому шарах епітелію, у порівнянні з тваринами інтактною групи. Щільність рецепторів до лектину арахісу на клітинах базального та рогового шарів не відрізняється від показників у інтактних та контрольних тварин (табл. 1).

Щільність розподілу рецепторів до лектину арахісу в епітелії інтактних тварин не відрізняється від показників групи контролю (табл.1), тому надалі в тексті ці терміни вживаються як синоніми.

На 5-ту добу післянатального життя в групі інтактних тварин кількість залишків β -D-галактози змінюється порівняно з попереднім терміном спостереження. Кількість рецепторів до лектину арахісу в шипуватому та зернистому шарах збільшується відносно 1-ї доби. У вакцинпреміюваних тварин на плазматичній мембрані та в цитоплазмі епітеліоцитів шипуватого та зернистого шарів

спостерігається незначне збільшення накопичення PNA-специфічних речовин, що проявляється зміною забарвлення зрізів до коричневого та темно-коричневого кольорів відповідно. Щільність відкладення бензидинової мітки в роговому шарі не відрізняється від групи контролю (табл. 1).

На 7-му добу в групі інтактних тварин кількість рецепторів до лектину арахісу, стосовно шарів епітелію, змінюється нерівномірно в порівнянні з 5-ою добою. Для епітеліоцитів базального шару щільність відкладення бензидинової мітки зменшена до 1, проте інтенсивність забарвлення клітин шипуватого шару зростає до 2,5. Роговий шар, як і в попередньому терміні, не забарвлюється (табл. 1). У вакцинпреміюваних тварин на епітеліоцитах шипуватого шару відзначається незначне збільшення кількості PNA+ сполук.

Для клітин зернистого та рогового шарів експресія бензидинової мітки залишається незмінною відносно групи контролю.

На 11-ту добу життя в групі контрольних тварин на плазматичній мембрані та в цитоплазмі епітеліоцитів шипуватого та зернистого шарів

Таблиця 1

Щільність розподілу рецепторів до лектину арахісу (PNA) в епітелії слизової ясен

Доба життя	Групи тварин	Б	Ш	З	Р
1	інтактні	0,5	1	1,5	0,5
	експеримент	0,5	1,5	2	0,5
	контроль	0,5	1	1,5	0,5
5	інтактні	0,5	1,5	2	0
	експеримент	1	2	2,5	0
	контроль	0,5	1,5	2	0
7	інтактні	0,5	1	2,5	0
	експеримент	0,5	1,5	2,5	0
	контроль	0,5	1	2,5	0
11	інтактні	0	1	2,5	0
	експеримент	0	1	2,5	0
	контроль	0	1	2,5	0
14	інтактні	0	1	2,5	0,5
	експеримент	0	1	3	0,5
	контроль	0	1	2,5	0,5
30	інтактні	0	1	2	0
	експеримент	0	1	2	0
	контроль	0	1	2	0
45	інтактні	0	1	2	0
	експеримент	0	1	2	0
	контроль	0	1	2	0

Примітки: Б-базальний шар епітелію, Ш – шипуватий шар епітелію, З – зернистий шар епітелію, Р – роговий шар епітелію

щільність відкладення бензидинової мітки не змінюється. Рецептори клітин рогового шару залишаються негативними до лектину арахісу. З 11-ї доби і до закінчення експерименту клітини базального шару епітелію стають PNA-негативними. Розподіл рецепторів до лектину арахісу в структурах епітелію антигенпреміюваних тварин не відрізняється від показників групи інтактних тварин.

На 14-ту добу післянатального розвитку у тварин всіх досліджуваних груп відзначається поява рецепторів до лектину арахісу в роговому шарі, одночасно збільшується кількість PNA+ специфічних речовин у зернистому шарі епітелію експериментальних тварин. Інтенсивність забарвлення клітин шипуватого шару у всіх групах тварин не відрізняється.

На 30-ту та 45-ту добу післянатального життя щільність залишків β -D-галактози знижується відповідно попереднього досліджуваного терміну. Плазматична мембрана та цитоплазма епітеліоцитів базального та рогового шарів епітелію слизової ясен залишається PNA-негативною у всіх піддослідних групах (див. табл. 1).

Щільність розподілу β -D-галактозоспецифічних рецепторів епітелію слизової ясен залежить від віку досліджуваних шурів і певного шару епітелію слизової ясен. У антигенпреміюваних тварин з 1-ї до 7-ї доби життя спостерігається збільшення щільності PNA+ речовин, що вказує на зменшення щільності лектингісторецепторного бар'єру і може бути підґрунтям для виникнення

порушень у гермінативній зоні епітелію ясен. З 11-ї доби виявляється зниження кількості рецепторів до лектину арахісу в шарах епітелію усіх досліджуваних груп, що є відображенням компенсаторних можливостей епітелію слизової ясен щодо відновлення лектингісторецепторного бар'єра для забезпечення здатності епітелію реалізувати захисну функцію від механічного та антигенного впливів. Внутрішньоплодове введення антигену плодам призводить до змін у панелі вуглеводних детермінант мембранних компонентів епітеліоцитів рогового та зернистого шарів. Це змінює властивості лектинопосередкованого бар'єра, що забезпечує захист гермінативної зони і має функціональне значення в антимікробному неспецифічному захисті слизової порожнини рота.

Висновки. 1. У новонароджених вакцинпреміюваних тварин змінюється лектингістохімічна характеристика епітелію слизової ясен, а саме: збільшується вміст PNA- специфічних сполук, що відображає порушення лектингісторецепторного бар'єра в зернистому шарі епітелію ясен. 2. Встановлені зміни розподілу вуглеводних залишків β -D-галактози в епітелії слизової ясен спостерігаються протягом перших двох тижнів та нівелюються до 45-ї доби післянатального розвитку.

Перспективи подальших досліджень. Планується встановити особливості розподілу вуглеводних залишків N-ацетил-D-галактозаміну (GalNAc) та SBA⁺ лімфоцитів в епітелії слизової ясен у ранньому постнатальному періоді в нормі та за умов антенатального антигенного впливу.

Список використаної літератури

1. Антонюк В.О. Лектини та їх сировинні джерела / В.О. Антонюк. – Львів: ПП “Кварт”, 2005. – 554 с.
2. Сырцов В.К. Лектин-гистохимическое исследование периферических органов иммунной системы человека в пренатальном периоде онтогенеза / В.К. Сырцов, Е.Г. Алиева // *Актуальні питання фармац. і мед. науки та практики.* – 2011. – № 1. – С. 42-44.
3. Волошин Н.А. Лектины животного и растительного происхождения: роль в процессах морфогенеза: (обзор лит. и собственных исследований) / Н.А. Волошин, Е.А. Григорьева // *Журн. АМН України.* – 2005. – Т. 11, № 2. – С. 223-237.
4. Siebert H.C. α 2,3/ α 2,6-Sialylation of N-glycans: non-synonymous signals with marked developmental regulation in bovine reproductive tracts. / H.C. Siebert, J. Rosen // *Biochimie.* – 2006. – № 88. – P. 399-410.
5. The sugar code: functional lectinomics. / H.J. Gabius, S. André, H. Kaltner [et al.] // *Biochim Biophys Acta.* – 2002. – № 1572. – P. 165-177.
6. Chemical biology of the sugar code. / H.J. Gabius, H.C. Siebert, S. André [et al.] // *Chem. BioChem.* – 2004. – №5. – P. 740-764.
7. Histochemical identification of sialylated glycans in *Xenopus laevis* testis. / V. Galder, A. Edurne, U. María [et al.] // *J. Anat.* – 2012. – № 221 (4). – P. 318-330.
8. Discovery and classification of glycan-binding proteins. / A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko [et al.] // *Essentials of Glycobiology.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory. – 2009. – P. 375-386.

ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ УГЛЕВОДНЫХ ОСТАТКОВ β -D-ГАЛАКТОЗЫ В ЭПИТЕЛИИ СЛИЗИСТОЙ ДЕСЕН КРЫС В НОРМЕ И ПОСЛЕ ВНУТРИУТРОБНОГО АНТИГЕННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

Резюме. Целью работы было определение особенностей распределения углеводов остатков β -D-галактозы в эпителии слизистой десен крыс в норме и после внутриутробного антигенного воздействия. У новорожденных вакцинированных животных меняется лектингистохимическая характеристика эпителия слизистой десен. Плотность распределения β -D-галактозоспецифических рецепторов эпителия слизистой десен зависит от возраста экспериментальных крыс и определенного слоя эпителия слизистой десен. У антигенпремированных животных с 1-х до 7-х суток жизни наблюдается увеличение плотности PNA+ соединений, что указывает на уменьшение плотности лектингисторецепторного барьера и может быть основой для возникновения нарушений в геминативной зоне эпителия десны. С 14-го дня и до окончания эксперимента в эпителии десен всех исследуемых групп выявляется снижение количества рецепторов к лектину арахиса, что является отражением компенсаторных возможностей по восстановлению лектингисторецепторного барьера для обеспечения способности эпителия реализовывать защитную функцию от механического и антигенного воздействия.

Ключевые слова: антиген, крыса, десны, внутриутробный период.

PECULIARITIES OF β -D-GALACTOSE CARBOHYDRATE RESIDUES DISTRIBUTION IN THE EPITHELIUM OF GUMS IN RATS IN THE NORM AND AFTER INTRAUTERINE ANTIGENIC ACTION

Abstract. The research was aimed to determine the peculiarities of β -d-galactose carbohydrate residues distribution in the epithelium of gums in rats in the norm and after intrauterine antigenic action. In newborn vaccine-premium animals lectin-histochemical characteristic of the gum epithelium is changed. The density of distribution of β -d-galactose-specific receptors of gum's epithelium depends on the age of the tested animals and on specific epithelium layer. In antigenpremium animals from the 1st to 7th day of life increase in density of PNA+ substances was observed which is indicative of decreased density of lectin-histo-receptor barrier and can be a basis for the appearance of disorders in the germinal zone of gum epithelium. From the 14th day and to the end of the experiment in gum epithelium of all tested groups the decrease of receptors quantity to peanut agglutinin is found that is an evidence of compensatory capabilities relatively to the recovery of lectin-histo-receptor barrier to provide the possibility of the epithelium to realize the protective function from mechanical and antigenic actions.

Key words: antigen, cancer, gums, prenatal period.

Zaporozhye State Medical University (Zaporozhye)

Надійшла 18.01.2016 р.
Рецензент – проф. Масна З.З. (Львів)