

© Кисельова Т.М., Шаповалова О.Ю., Пушкар М.С., Соловійова Л.О., 2009

УДК: 611-018.5:616-018:54:616.36:591.4:616.36-002:615.838/849

SBA-ЛЕКТИНОГІСТОХІМІЧНІ МАРКЕРИ ПЕРЕТВОРЕНЬ У СТРУКТУРАХ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ІЗ МОДЕЛЬОВАНИМ АВТОІМУННИМ ГЕПАТИТОМ ТА ПРИ ДІЇ ВОДНИМИ І РАДОНОВИМИ ВАННАМИ

Кисельова Т.М., *Шаповалова О.Ю., Пушкар М.С., Соловійова Л.О.

*Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, м.Вінниця; *Кримський Національний медичний університет ім. М.І. Георгієвського*

РЕЗЮМЕ: при визначенні SBA-позитивних сполучень виявлено раніше невідомі періоди перетворень структурних компонентів печінки щурів у нормі, при АІГ та АІГ після двох курсів водних і радонових ванних процедур: визначені ефекти поступової зміни глікокон'югатів на поверхні і в цитоплазмі клітин паренхіми і строми печінки під впливом патологічного процесу – гепатита і гепатита в умовах впливу на організм радонових процедур відображають певну послідовність включення різних механізмів патоморфогенеза та адаптації.

Ключові слова: глікополімери, глікокон'югати, лектин сої (SBA), бензидинова позначка, автоімунний гепатит (АІГ), структури часточок і триад, радон

Вступ. Новим сучасним методом вивчення глікополімерів, якими є глікопротеїни та гліколіпіди в клітинах і тканинних екстрацелюлярних структурах, зокрема в процесі морфогенезу, патогенезу захворювань і канцерогенезу, стала лектиногістохімія [1-3]. Глікополімерні сполуки складають структурну і функціональну основу клітин і тканин, входять до складу плазматичних мембран, глікокаліксу, цитоплазматичних включень, сполучнотканинних волокон і аморфної речовини. Вони фактично є сигнальними і рецепторними молекулами.

Лектин (Lectin) – представник групи білків, що має здатність специфічно сполучатись із розгалуженими вуглеводними молекулами глікопротеїнів і гліколіпідів. Існують чисельні ендогенні лектини. Синтез і послідовність появи глікокон'югатів на поверхні клітин генетично детерміновані, отже й змінюються в умовах патологічних процесів [6, 8-11], – так само, як детерміновані синтез і послідовність включення в плазмолему (або вихід з неї) ендогенних лектинів. Існування в організмі в онтогенезі розпізнавання й зв'язування таких глікополімерів ендогенними лектинами, що має назву «лектин-рецепторні взаємодії», може запускати лектинозалежні регуляції клітинних функцій і клітинні взаємодії, що обумовлюють диференціювання, адаптацію тканин. У наукових морфологічних дослідженнях використовуються численні екзогенні лектини, які отримують переважно з насіння різних рослин.

АІГ – прогресуючий гепатоцелюлярний процес невідомої етіології, що характеризується перипортальним чи з переходом на паренхіму запальним процесом, наявністю гіпергаммаглобулінемії та тканинних печінково-асоційованих аутоантитіл. До найбільш частих причин неінфекційного характеру, що викликають хронічні гепатити, відносять дію токсинів, алкоголю, глибокі порушення обміну речовин, аутоімунні

зміни [7]. Ключова роль у патогенезі АІГ належить дефекту імунорегуляції, що проявляється у втраті толерантності до власних антигенів. Під впливом факторів це веде до появи «заборонених» клонів лімфоцитів, сенсibilізованих до аутоантигенів печінки та викликаючих пошкодження гепатоцитів. Серед наслідків порушення імунорегуляції, безпосередньо здійснюючих деструкцію тканин печінки, найбільш вірогідним є домінуюче значення Т-клітинної цитотоксичності.

З вивчених літературних джерел відомо, що дослідження гістотопографії рецепторів лектинів у здоровій печінці щурів, у разі гепатиту і після проведення курсу радонових процедур фактично відсутні. Радоновим ваннам віддали перевагу перед існуючими в світі методами лікування АІГ як фактору, що забезпечує формування стану неспецифічної довготривалої адаптації резистентного типу з абсолютним домінуванням клітинного імунітету [4], якою, як відомо, регулюється і підтримується структурний гомеостаз в організмі.

Мета дослідження – дослідити динаміку змін в експресії рецепторів до лектинів сої різних структур печінки в нормі, при розвитку аутоімунного гепатиту та під впливом водних і радонових курсових ванн.

Матеріали та методи дослідження. На лабораторних білих нелінійних щурах здійснено моделювання аутоімунного гепатиту шляхом підшкірного введення, за певною схемою, печінкового антигену з неповним ад'ювантом Фрейнда. Через певні терміни від моделювання двічі проводили курси водних і радонових ванн за курортними рекомендаціями. Вивчали різні морфофункціональні маркери прогресування АІГ, а також прояви спонтанної і корегованої регенерації. До гістологічних методів долучали лектиногістохімію з використанням лектину сої (SBA). Матеріал фіксували 10% нейтральним

формаліном і заливали в парафін. Оглядові препарати фарбували гематоксилін-еозин. Парафінові зрізи накладали на адгезивні скельця, вкриті полі лізином («Menzel – Glasser», Німеччина). Серійні зрізи після депарафінізації занурювали в 96° етанол, а потім для інактивації ендогенної пероксидази здійснювали 20-хвилинну інкубацію в метанолі з 0,3% вмістом перекису водню. Препарати обробляли з використанням стандартних наборів «Лектинотест» у розведенні Л 1:50 за рекомендованою методикою [5]. Враховували забарвлення від світло-бежевого до темно-коричневого. Інтенсивність оцінювали в балах: 0 – відсутність забарвлення; 1 – дуже слабке; 2 – слабке; 3 – помірне; 4 – сильне. В даному повідомленні представлені результати вивчення гістотопографії і кількості рецепторів лектину SBA в клітинах печінки, клітинах Купфера, в ендотелії синусоїдних ге-

мокапілярів часточок і судин у тріадах, в останніх також в епітеліоцитах жовчних проток, клітинах і волокнах сполучнотканинної стромы печінки щурів усіх серій експерименту.

Результати та їх обговорення. В печінці щурів контрольної групи глікополімери з кінцевими нередукуючими залишками N-ацетил-D-галактозаміна, які є рецепторами лектина сої, наявні в малих кількостях лише в клітинах Купфера (табл. 1). Водні ванні процедури не впливають на експресію рецепторів лектина сої (табл. 1). Повторні радонові ванни до кінця п'ятого місяця експерименту трішки змінюють гістотопографію і кількість N-ацетил-D-галактозамінокон'югатів (табл. 1). Ці біополімери зникають із цитоплазми клітин Купфера. В ендотелії центральних вен, часточок та найбільше в ендотелії печінкової артерії і ворітної вени з'являються рецептори лектина сої.

Таблиця 1

Кількісний склад рецепторів лектина сої в структурах печінки щурів контрольної групи і після двох курсів водних і радонових ванних процедур.*

Назва структур	Кінець першого місяця	Кінець другого місяця після першої порції		Кінець четвертого місяця	Кінець п'ятого місяця після другої порції	
		Водних ванн	Радонових ванн		Водних ванн	Радонових ванн
Гепатоцити						
Цитолема цитоплазма	0	0	0	0	0	0
Клітини Купфера	1	1	1	1	1	0
Ендотелій синусоїдних гемокапілярів	0	0	0	0	0	1
Ендотелій центральних вен	0	0	0	0	0	2
Ендотелій печінкових артерій тріад	0	0	0	0	0	2
Ендотелій ворітних вен тріад	0	0	0	0	0	2
Епітелій жовчних проток тріад	0	0	0	0	0	0

Примітка: *Інтенсивність реакції, яка розвинулася, оцінювали у балах: 0 – відсутність реакції, 1 бал – дуже слабка реакція, 2 бали – слабка реакція, 3 бали – середня реакція, 4 бали – сильна реакція.

На ранніх термінах розвитку модельованого гепатиту рецептори лектина сої в малих кількостях виявляються в складі цитолеми клітин печінки (рис. 1). Цитоплазма залишається без бензидинової мітки (табл. 2). Сліди місць зв'язування лектина наявні також в ендотелії синусоїдних капілярів у часточках і ворітної вени в тріадах. Клітини Купфера не змінюють експресію SBA-позитивних сполук. Притаманне гепатиту розростання пухкої сполучної тканини в порталних ділянках супроводжується накопиченням в її клітинах N-ацетил-D-

галактозамінокон'югатів. Волокна не мають бензидинової мітки.

Поглиблення патологічного процесу в печінці в кінці другого місяця йде з подальшою перебудовою лектин-рецепторних систем. У цитоплазмі гепатоцитів з'являється невелика кількість біополімерів із вуглеводною детермінантою N-ацетил-D-галактозаміна (рис. 2). Збільшувалась кількість таких сполук у цитоплазмі клітин Купфера (табл. 2). В ендотелії усіх судин печінки і епітелії жовчних проток наявна неясна бензидинова мітка.

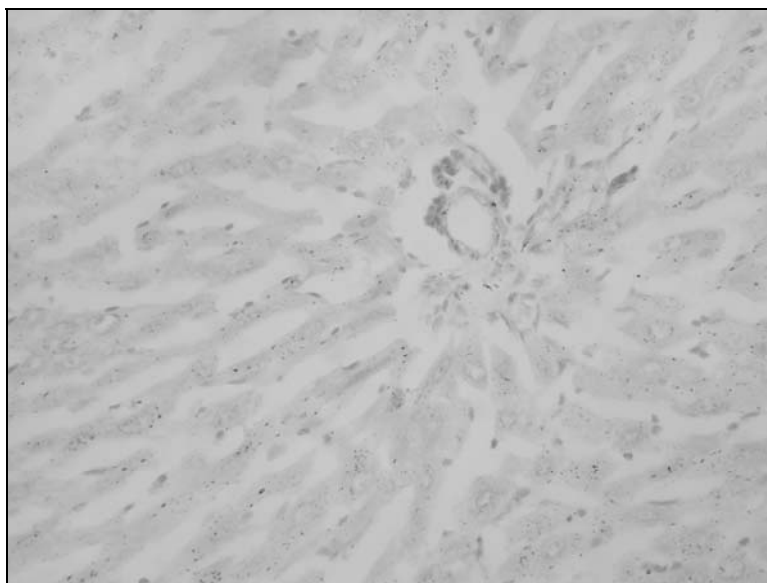


Рис. 1. Зріз печінки при гепатиті в кінці першого місяця експеримента. Оброблення кон'югатом лектина сої з пероксидазою хрину. Прояв у системі діамінобензидин – H₂O₂. Збільшення: об.40, ок. 10. (пояснення в тексті).

Таблиця 2

Кількісний склад рецепторів лектина сої (SBA) в структурах печінки щурів із гепатитом і після двох курсів водних ванних процедур.*

Назва структур	Кінець першого місяця	Кінець другого місяця після першого курсу		Кінець четвертого місяця	Кінець п'ятого місяця після другого курсу	
		АІГ	Водні ванни		АІГ	Водні ванни
Гепатоцити	1	1	1	2	3	3
Цитолема		1	1	1	3	3
Цитоплазма		0	1	1	1	3
Клітини Купфера	1	2	2	2	4	4
Ендотелій синусоїдних гемокапілярів	1	1	1	2	3	3
Ендотелій центральних вен	0	1	1	1	3	3
Ендотелій печінкових артерій триад	0	1	1	2	3	3
Ендотелій ворітних вен триад	1	1	1	1	3	3
Епітелій жовчних проток триад	0	1	1	2	4	4
Сполучна тканина стромы	2					
Клітини		2	2	3	4	4
Волокна		0	0	1	2	2

Примітка: *Інтенсивність реакції, яка розвинулася оцінювали у балах: 0 – відсутність реакції, 1 бал – дуже слабка реакція, 2 бали – слабка реакція, 3 бали – середня реакція, 4 бали – сильна реакція.

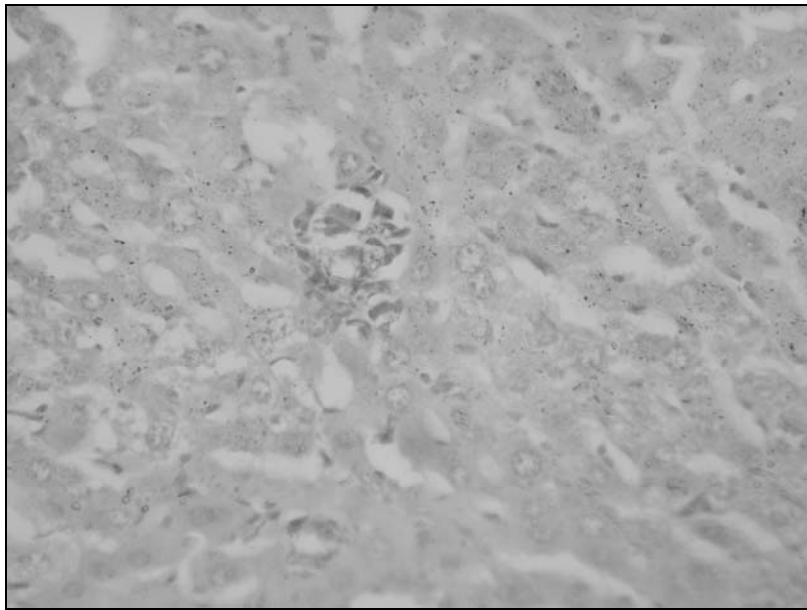


Рис. 2. Зріз печінки при гепатиті в кінці другого місяця експеримента. Оброблення кон'югатом лектина сої з пероксидазою хрину. Прояв у системі діамінобензидин – H_2O_2 . Збільшення: об.40, ок. 10. (пояснення в тексті).

Через чотири місяці рецептори лектина сої зростають у кількості на цитолемі гепатоцитів, в ендотелії синусоїдних гемокапілярів і печінкових артерій та епітелії жовчних проток триад (рис.3). Клітини сполучної тканини портальних ділянок накопичують значну кількість таких сполук. Уперше виявляються сліди бензидинової мітки на колагенових волокнах.

До кінця п'ятого місяця експерименту структури печінки накопичують велику кількість відсут-

ніх у контролі N-ацетил-D-галактозамінокон'югатів (табл. 2). Багато рецепторів лектина сої в гепатоцитах і ендотелії всіх судин (рис. 4). Дуже багато SBA-позитивних сполук у клітинах Купфера, епітелії жовчних проток триад і клітинах пухкої сполучної тканини портальних зон. Колагенові волокна портальних ділянок також набувають незначної кількості вуглеводних детермінант N-ацетил-D-галактозаміна.

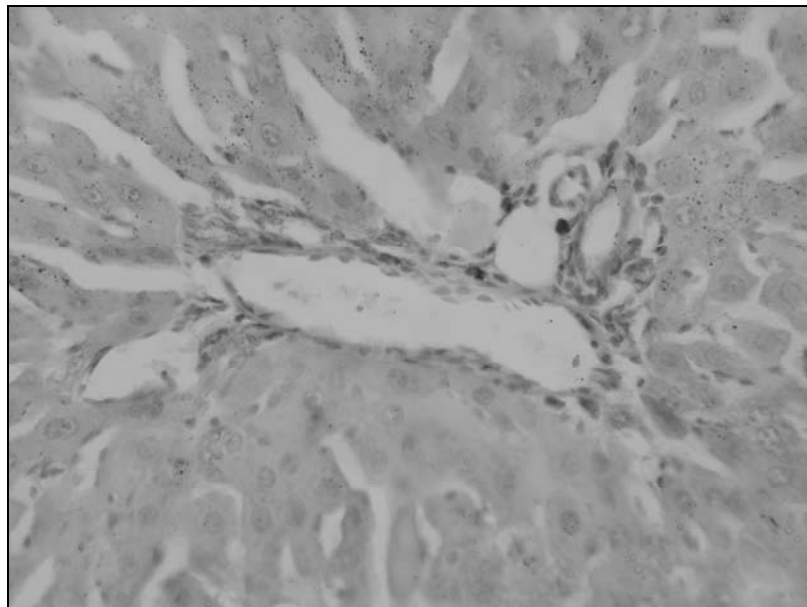


Рис. 3. Зріз печінки при гепатиті в кінці четвертого місяця експеримента. Оброблення кон'югатом лектина сої з пероксидазою хрину. Прояв у системі діамінобензидин – H_2O_2 . Збільшення: об.40, ок. 10. (пояснення в тексті).

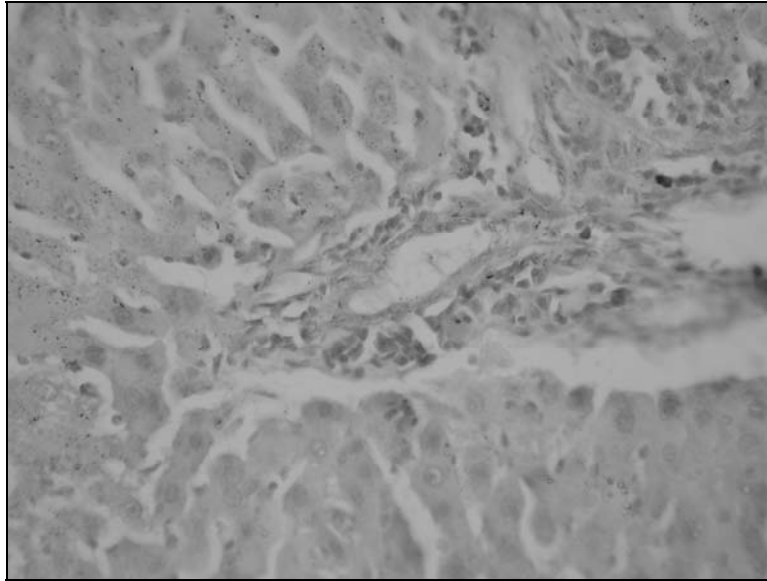


Рис. 4. Зріз печінки при гепатиті в кінці п'ятого місяця експеримента. Оброблення кон'югатом лектина сої з пероксидазою хрину. Прояв у системі діамінобензидин – H₂O₂. Збільшення: об.40, ок. 10. (пояснення в тексті).

Водні ванні процедури не впливають на гістотопографію рецепторів лектина сої в структурах печінки щурів хворих на гепатит (табл. 2). Динаміка перебудови лектин-рецепторних систем відповідна, як і при гепатиті.

Після першого курсу радонових ван у кінці другого місяця в печінці при гепатиті не спостерігалось

змін гістотопографії рецепторів лектина сої в порівнянні з такою при гепатиті початкових періодів розвитку (табл. 3). Але кількісно SBA – позитивних біополімерів у клітинах Купфера, в ендотелії печінкових артерій і епітелії жовчних проток триад накопичується менше, ніж в аналогічні періоди розвитку гепатита без радонових ванн (табл. 2).

Таблиця 3

Кількісний склад рецепторів лектина сої (SBA) в структурах печінки щурів із гепатитом і після двох курсів радонових ванн*

Назва структур	Кінець першого місяця	Кінець другого місяця після першого курсу радонових ванн	Кінець четвертого місяця	Кінець п'ятого місяця після другого курсу радонових ванн	
				АП	радонові ванни
Гепатоцити					
Цитолема	1	1	2	3	2
Цитоплазма	0	1	1	3	2
Клітини Купфера	1	1	2	4	3
Ендотелій синусоїдних гемокапілярів	1	1	2	3	1
Ендотелій центральних вен	0	1	1	3	1
Ендотелій печінкових артерій триад	0	0	2	3	2
Ендотелій ворітних вен триад	1	1	2	3	2
Епітелій жовчних проток триад	0	0	1	4	1
Сполучна тканина стромы					
Клітини	2	2	3	4	1
Волокна	0	0	1	2	0

Примітка: *Інтенсивність реакції, яка розвинулася, оцінювали у балах: 0 – відсутність реакції, 1 бал – дуже слабка реакція, 2 бали – слабка реакція, 3 бали – середня реакція, 4 бали – сильна реакція.

У віддалені терміни через 2 місяця після радонових ван N-ацетил-D-галактозамінокон'югатів у структурах печінки при гепатиті, все ще менше, ніж без радонових ван (табл. 3). Гепатоцити, ендотелій синусоїдних гемокапілярів, епітелій стінки жовчних проток триад і клітини пухкої сполучної тканини містять тільки сліди бензидинової мітки. Ендотелій печінкових артерій триад і колагенові волокна строми залишаються ареактивними.

Після другого курсу радонових ван в кінці

п'ятого місяця від початку експеримента експресії SBA-позитивних глікополімерів у структурах печінки при гепатиті не досягає рівня при гепатиті без радонових ван (табл. 2-3). Невелика кількість таких сполук знаходиться на цитолемі гепатоцитів, в ендотелії печінкових артерій і ворітної вени в триаді. Дуже мало їх в ендотелії синусоїдних гемокапілярів часточок, в епітелії жовчних проток триад, і в клітинах сполучної тканини строми. Колагенові волокна не зв'язують бензидинову мітку (рис. 5).

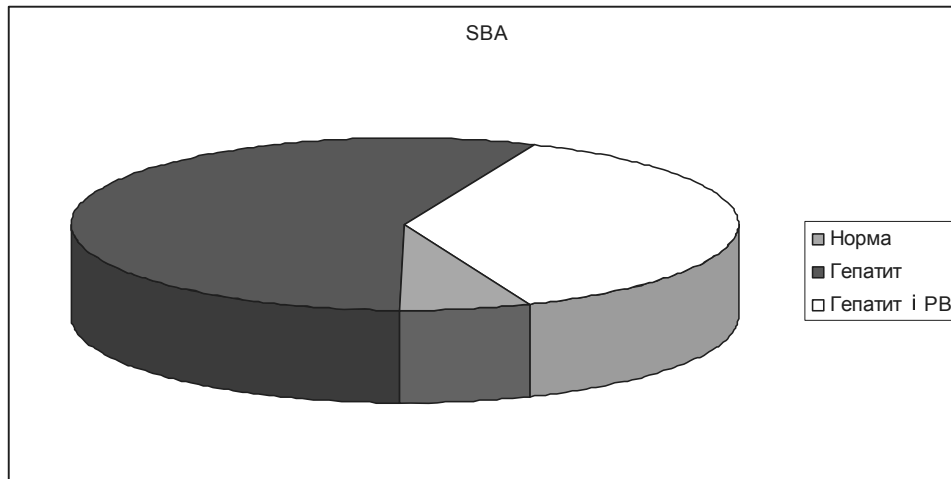


Рис. 5. Вміст рецепторів лектину сої в цитоплазмі гепатоцитів печінки щурів контрольної групи, при гепатиті і після двох курсів радонових ванн

Висновки. 1. Характерним для структур печінки контрольних щурів у визначенні в них N-ацетил-D-галактозамінокон'югатів, що маркуються як рецептори лектину сої (SBA), є присутність малої їх кількості лише в клітинах Купфера.

2. В розв'язку АІГ до кінця п'ятого місяця експерименту всі структури печінки, що вивчалися, статистично достовірно нагромаджують значну патологічну для них кількість таких рецепторів.

3. Під впливом на організм щурів з АІГ двох курсів радонових ванн дуже суттєво змінюються

локалізація та вміст рецепторів лектину сої в напрямку зменшення їх експресії в усі терміни експерименту.

Планується подальше використання лектиногістохімічних, електронномікроскопічних та гістоморфометричних методів на базі проведених експериментів із метою визначення найбільш вагомих діагностичних ознак перебігу модельованого аутоімунного процесу та певних кореляцій їх із подібними даними у тварин, що лікувалися радоном.

ЛІТЕРАТУРА

1. Волошин Н.А. Использование методов лектиновой гистохимии в морфологии / Н.А. Волошин, Е.А. Григорьева, М.А. Довбыш // Таврический медико-биологический вестник. – 2004. – Т. 7, № 4. – С. 40-41.
2. Волошин Н.А. Лектины животного и растительного происхождения: роль в процессах морфогенеза / Н.А. Волошин, Е.А. Григорьева // Теоретична медицина. – 2005. – Т. I, № 2. – С. 223-237.
3. Волошин Н.А., Пашенко С.Н. Роль лектинов в диагностике и лечении злокачественных новообразований / Н.А. Волошин, С.Н. Пашенко // Запорожский мед. журнал. – 2004. – Т. 24, № 3. – С. 93-96.
4. К вопросу об иммуногенной составляющей в лечебном действии радоновых ванн / Л.А. Соловьева, М.С. Пушкарь, Т.Н. Киселева, Е.Л. Церковнюк // Совр. проблемы клинической патоморфологии: С.-Пб., 2005. – С. 244-246.
5. Луцик А.Д. Лектины в гистохимии / А.Д. Луцик, Е.С. Детюк, М.Д. Луцик. – Львов: Вища школа, 1989. – 144 с.
6. Ушаков А.В. Локализация рецепторов лектинов в миокарде человека в норме и при сахарном диабете / А.В. Ушаков, Е.Ю. Шаповалова // Клінічна анатомія та оперативна хірургія. – 2005. – Т. 4, № 2. – С. 9-11.
7. Хазанов А.И. Современные проблемы вирусных и алкогольных болезней печени / А.И. Хазанов // Рос. Журнал гастроэнтеролог., гепатол., колопроктол. – 2002. – № 2. – С. 6-15.
8. Чайковский Ю.Б. Кількісне визначення рецепторів пектинів SNA, WGA, STA в ендометрії / Ю.Б. Чайковский, І.В. Копійка // Світ медицина та біології. – 2006. – № 3. – С. 82-86.
9. Чайковский Ю.Б. Порівняльний лектиногістохімічний аналіз ендометрію в нормі, при гіперплазіях та аденокарциномах / Ю.Б. Чайковский, І.В. Копійка // Вісник проблем біології і медицини. – 2006. – Вип.2. – С.334-338.

10. Чемоданова Е.И. Метод лектиногистохимии в дифференциальной диагностике красной волчанки / Е.И. Чемоданова, О.А. Прилуто, Е.Ю. Шаповалова // Таврический медико-биологический вестник. – 2003. – Т. 6, № 3. – С. 132 - 133.
11. Ponder B.A.Y. Lectin histochemistry / B.A.Y. Ponder // Immunocytochemistry. Practical applications in pathology and biology (eds. J.M. Polak, S. van Noorden). – Bristol., 1983. – P. 129-142.

SUMMARY

SBA – LEKTINOHYSTOCHEMICAL MARKERS OF TRANSFORMATION IN LIVER STRUCTURES OF RATS WITH MODELING AUTOIMMUNE HEPATITIS AND BY INFLUENCE OF AQUEOUS AND RADON'S PROCEDURES

Kiselyova T. M. Shapovalova O. Y., Pushkar M.S., Solovyova L.O.

It was exposure unknown periods of transformations of the structural components of liver in norm by the detection of SBA-positive compounds, by AIG and AIG after two courses of aqueous and radon's procedures. It was exposure effects of piecemeal replacement of glucoconjugates on the surface and in egtoplasmе of parenchimal and stromal liver cells under the impact pathological process – of hepatitis and hepatitis by effect of radon on the organism. These processes are reflects (represent) of specified succession of involve differences mechanisms of pathomorphogenesis and adaptation.

Key words: autoimmune hepatitis, radon, regeneration, glycopolimers, glycoconjugates, lectin (SBA), benzidineshifs, structure of lobules and triads