© Т.М. Кисельова, О.Ю. Шаповалова*, Л. О. Соловйова, О.І. Тереховська, Р. В. Харковенко

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

Т.М. Кисельова, О.Ю. Шаповалова*, Л. О. Соловйова, О.І. Тереховська, Р. В. Харковенко

ЗАКОНОМІРНОСТІ ЗВ'ЯЗУВАННЯ ЛЕКТИНУ РИЦИНИ (RCA) СТРУКТУРАМИ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ З МОДЕЛЬОВАНИМ АВТОІМУННИМ ГЕПАТИТОМ ТА ПРИ ДІЇ ВОДНИМИ ТА РАДОНОВИМИ ВАННАМИ

Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова (м. Вінниця)

***Кримський Національний медичний університет**

ім. М.І. Георгієвського (м. Симферопіль)

Робота виконана в межах НДР кафедр гістології, фармації, науково - експериментальної клініки, обл. фізіотерапевтичної лікарні м. Хмільник

Назва наукової теми «Морфофункціональні дослідження спонтанної і корегованої регенерації при експериментально - патологічних станах, № держ. реєстрації 0109U004935.

Вступ. 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.

Найсучаснішім 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, 2, 3, 12, 13].

Лектин (Lectin) – представник групи білків, що має здатність специфічно сполучатись з 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 [8, 10, 11, 15], - 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. В наукових морфологічних дослідженнях використовуються численні екзогенні лектини, які отримують переважно з насіння різних рослин.

Лектини застосовуються в якості селективних та чуттєвих зондів, що дозволяють вивчати розподілення вуглевод утримуючих молекул – глікокон'югатів – у тканьових та клітинних структурах [14].

В основі властивості лектинів вибірково зв'язуватись з окремими типами клітин, а у ряді випадків із окремими субпопуляціями у складі нерозпізнаваних за іншими морфо- і гістогенетичними ознаками клітинних елементів, лежить їхня властивість проявляти максимальну спорідненість до олігосахаридів строго визначеної структури. Зважаючи на вплив додаткових факторів зв'язування – характеру глікозидних зв'язків, просторової конфігурації олігосахаридного ланцюга, зарядів кінцевого вуглеводного залишка глікокон'югата і активного центру лектина, відсутності стереохімічних перешкод для взаємодії лектина з його рецепторами, - авідність лектина до відповідного вуглеводвмісного біополімера обумовлює взаємодію того чи іншого лектина з глікокон'югатами строго відповідного різновиду клітин [6].

Лектинна гістохімія, як високоселективний метод, дозволяє оцінювати зміни складу і властивостей глікокон'югатів клітин і тканин в залежності від характеру і прояву патологічного процесу, а також ідентифікувати і визначати локалізацію окремих вуглеводних детермінант.

АІГ – прогресуючий гепатоцелюлярний процес невідомої етіології, що характеризується перипортальним, чи з переходом на паренхіму, запальним процесом, наявністю гіпергамаглобулінемії та тканинних печінково-асоційованих автоантитіл. До найбільш частих причин неінфекційного характеру, що викликають хронічні гепатити, відносять дію токсинів, алкоголю, глибокі порушення обміну речовин, автоімунні зміни [9]. Ключова роль в патогенезі АІГ належить дефекту імунорегуляції, що проявляється втратою толерантності до власних антигенів. Це веде до появи «заборонених» клонів лімфоцитів, сенсибілізованих до автоантигенів печінки та пошкоджуючих гепатоцити. 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, в разі гепатиту і після проведення курсу радонових процедур фактично відсутні. Радоновим ваннам віддали перевагу перед існуючими в медичній практиці методами лікування АІГ, як фактору, що забезпечує формування в організмі стану неспецифічної довготривалої адаптації резистентного типу з абсолютним домінуванням клітинного імунітету [7], яким, як відомо, здійснюється регуляція і збереження структурного гомеостазу.

Мета роботи полягала у дослідженні вірогідності ефективної заміни фармакологічної терапії імунопатологічних процесів, зокрема АІГ (автоімунний

гепатит), альтернативними заходами з курортологічного досвіту.

Об'єкт і методи дослідження. На лабораторних білих нелінійних щурах здійснено моделювання автоімунного гепатиту шляхом підшкірного введення, за певною схемою, печінкового антигену з неповним ад'ювантом Фрейнда. Через певні терміни від завершення 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 рицини RCA. Матеріал фіксували 10% нейтральним формаліном і заливали в парафін. Оглядові препарати фарбували гематоксилін - еозином. Німеччина). Серійні зрізи накладали на адгезивні скельця, вкриті полілізином («Menzel - Glasser», Німеччина, і після депарафінізації занурювали в 96є 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 [6].

Інтенсивність зафарбованості різних структур в зрізах лектином оцінювали в балах порядкової шкали інтенсивності реакції. Зв'язок колірної і порядкової шкал представлені у **таблиці 1.**

В даному повідомленні представлені результати вивчення гістотопографії і кількості рецепторів лектину рицини в клітинах печінки, клітинах Купфера, в ендотелії синусоїдних гемокапілярів часточок і судин в тріадах, в останніх також в епітеліоцитах жовчних проток, клітинах і волокнах сполучнотканинної строми печінки щурів усіх серій експерименту.

Таблиця 1

Інтенсивність забарвлення і її оцінка в балах

Колірна шкала		Порядкова шкала інтенсивності фарбування	
Колір	Позначення	Ступінь реакції	Бали
Відсутній	–	відсутній	0
Блідо-бежевий	+	Дуже слабкий	1
Світло-коричневий	++	слабкий	2
коричневий	+++	середній	3
Темно-коричневий	++++	сильний	4

Примітка: використання порядкової шкали оцінювання інтенсивності фарбування дозволило в подальшому оцінювати статистичне значення різниць в вибірках з використанням непараметричних критеріїв, також Т-критерія Уілкоксона для зв'язаних вибірок (додаток 1).

Результати досліджень та їх обговорення. В структурах здорової печінки щурів контрольної групи наявна порівняно велика кількість глікополімерів з кінцевими нередукуючими залишками бета-D-галактози, екранованою сіаловою кислотою, які є рецепторами лектину рицини **(табл. 2).** Найбільш багаті такими сполуками ендотеліоцити центральних вен часточок і клітин Купфера. Багато їх в ендотелії інших судин і в епітелії жовчних проток тріад **(рис. 1)**. Гепатоцити експресують невелику кількість місць зв'язування лектину рицини.

Водні ванні процедури не впливають на гістотопографію і кількість рецепторів лектину рицини в досліджених структурах здорової печінки **(табл.2)**.

Після двох курсів радонових ванн до кінця п'ятого місяця експеримент та виявляються деякі зміни в локалізації і кількості рецепторів лектину рицини

Таблиця 2

Кількісний склад рецепторів лектину рицини RCA в структурах печінки щурів інтактної контрольної групи і після двох курсів водних і радонових ванних процедур

Назва Структур	Кінець першого місяця	Кінець другого місяця – після першого курсу		Кінець четвертого місяця	Кінець п'ятого місяця – після другого курсу	
		Водних ванн	Радонових ванн		Водних ванн	Радонових ванн
Гепатоцити Цитолема цитоплазма	 2 2	 2 2	 2 2	 2 2	 2 2	 2 2
Клітини Купфера	4	4	4	4	4	3
Ендотелій синусоїдних гемокапірярів	3	3	3	3	3	3
Ендотелій центральних вен	4	4	4	4	4	3
Ендотелій печінкових артерій тріад	3	3	3	3	3	3
Ендотелій ворітних вен тріад	3	3	3	3	3	2
Епітелій жовчних проток тріад	3	3	3	3	3	3

(табл.2). Знижується кількість RCA-позитивних біополімерів в клітинах Купфера і в ендотелії центральних вен часточок і портальних вен тріад **(рис. 2)**.

Індукований гепатит на початку і в кінці експеримента супроводжувався різкою редукцією біополімерів з вуглеводною детермінантою бета-D-галактози, екранованою сіаловою кислотою **(табл.3)**. Ці сполуки повністю припиняють синтезуватися гепатоцитами і ендотелієм синусоїдних гемокапілярів часточок **(рис. 3, 4)**.

Невелика їх кількість зберігається в клітинах Купфера, в ендотелії центральних вен часточок і ворітних вен тріад і в клітинах пухкої сполучної тканини проліферованої строми. В епітелії жовчних проток тріад наявні сліди бензидинової мітки. Колагенові волокна строми ареактивні і невидимі.

Водні ванні процедури не впливають на перебіг патологічних змін при гепатиті, не змінюють кількості і локалізації рецепторів лектину рицини в структурах печінки **(табл.3)**.

Після першого курсу радонових ванн в структурах печінки при гепатиті відбувається зміна гістотопографії і збільшення кількості RCA -позитивних біополімерів у порівнянні з печінкою щурів, хворих на гепатит, але не лікованих **(табл.3)**. Гепатоцити і ендотеліоцити синусоїдних капілярів часточок експресують малу кількість таких макромолекул, відсутніх при не лікованому гепатиті **(рис. 5)**. Клітини Купфера, ендотелій печінкових артерій і ворітних вен тріад і епітелій жовчних проток тріад накопичують велику кількість RCA – позитивного матеріалу. Ендотелій центральних вен часточок має такі сполуки. Клітини і волокна строми залишаються на такому ж рівні по відношенню до рецепторів лектину рицини.

До кінця п'ятого місяця після повторного курсу радонових ванн експресія глікополімерів з кінцевими нередукуючими залишками бета-D-галактози, екранованої сіаловою кислотою, в структурах печінки при гепатиті збільшується, але не досягає рівня, як у здорової печінки **(табл. 3)**. В цитоплазмі гепатоцитів і ендотеліоцитів синусоїдних гемокапілярів часточок таких сполук нормована кількість, а на цитолемі гепатоцитів трішки менше. Багато RCA-позитивних сполук у всіх інших досліджених структурах печінки. Клітини і волокна строми, яка розрослась не змінюють кількості рецепторів лектину рицини, залишаючись на рівні, як при гепатиті без радонових ванн.

Висновки.

1. В печінці щурів контрольної гупи виявляється велика кількість місць зв'язування лектину рицини

Таблиця 3

Кількісний вміст рецепторів лектину рицини RCA в структурах печінки щурів з гепатитом і після двох курсів водних і радонових ванних процедур

Назва структур	Кінець першого місяця	Кінець другого місяця – після першого курсу		Кінець четвертого місяця	Кінець п'ятого місяця – після другого курсу	
		Водних ванн	Радонових ванн		Водних ванн	Радонових ванн
Гепатоцити Цитолема Цитоплазма	 0 0	 0 0	 0 0	 1 1	 0 0	 1 2
Клітини Купфера	2	2	2	3	2	3
Ендотелій синусоїдних гемокапірярів	0	0	0	1	0	2
Ендотелій центральних вен	2	2	2	2	2	3
Ендотелій печінкових артерій тріад	2	2	2	3	2	3
Ендотелій ворітних вен тріад	2	2	2	3	2	3
Епітелій жовчних проток тріад	1	1	1	3	1	3
Сполучна тканини строми						
Клітини	2	2	2	2	2	2
Волокна	0	0	0	0	0	0

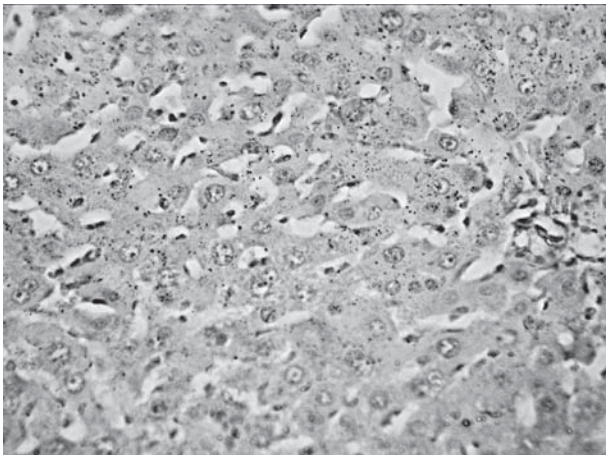

Рис. 1. Зріз печінки щурів контрольної групи. Оброблення кон'югатом лектину рицини з пероксидазою хріну. Прояв в системі диамінобензидин - H2O2. Збільшення: об.40, ок. 10. (пояснення в тексті).

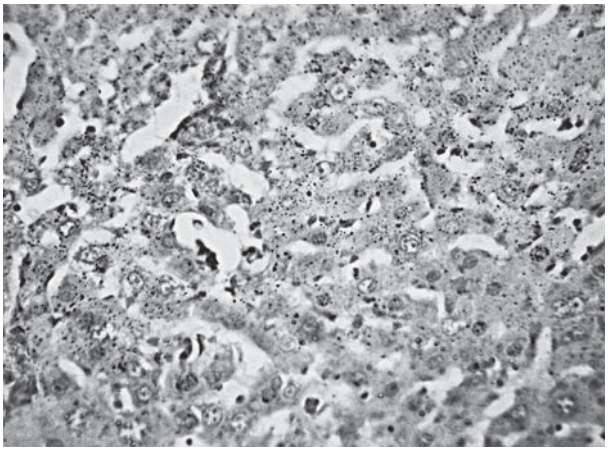

Рис. 2. Зріз печінки щурів контрольної групи до кінця п'ятого місяця експерименту (після двох курсів радонових ванн). Оброблення кон'югатом лектину рицини з пероксидазою хріну. Прояв в системі диамінобензидин - H2O2. Збільшення: об.40, ок. 10. (пояснення в тексті).

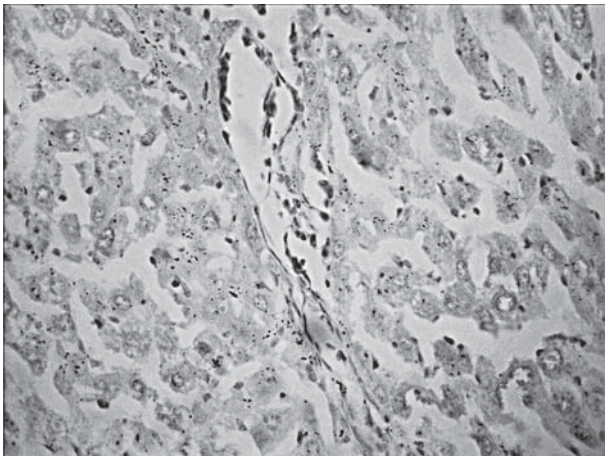

Рис. 3. Зріз печінки щурів з гепатитом до кінця першого місяця експерименту. Оброблення кон'югатом лектину рицини з пероксидазою хріну. Прояв в системі диамінобензидин - H2O2. Збільшення: об.40, ок. 10. (пояснення в тексті).

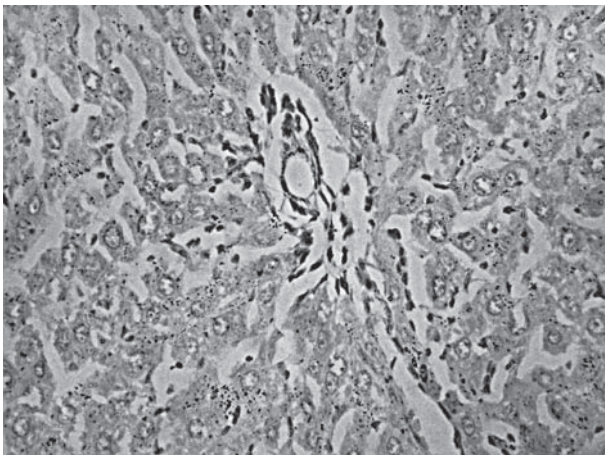

Рис. 4. Зріз печінки щурів з гепатитом до кінця п'ятого місяця експерименту. Оброблення кон'югатом лектину рицини з пероксидазою хріну. Прояв в системі диамінобензидин - H2O2. Збільшення: об.40, ок. 10. (пояснення в тексті).

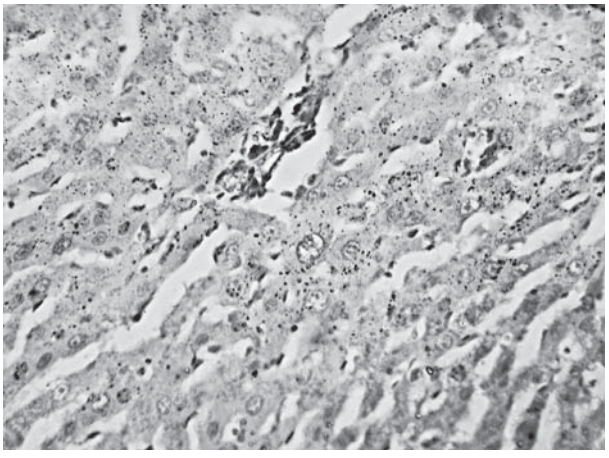

Рис. 5. Зріз печінки щурів з гепатитом до кінця другого місяця експерименту після першої порції радонових ванн. Оброблення кон'югатом лектину рицини з пероксидазою хріну. Прояв в системі диамінобензидин - H2O2. Збільшення: об.40, ок. 10. (пояснення в тексті).

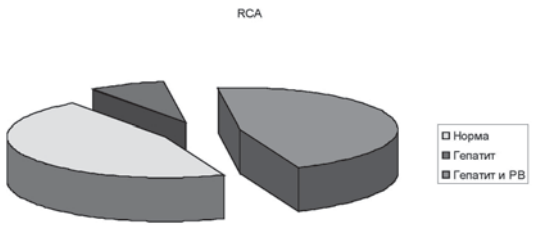

Рис. 6. Вміст рецепторів лектину рицини в цитоплазмі гепатоцитів печінки щурів контрольної групи, при гепатиті і після двох курсів радонових ванн.

(рис. 6). Ці глікополімери з кінцевим нередукуючими залишком бета-D-галактози, екранованої сіалової кислотою, менш за все синтезується в гепатоцитах .

2. Дуже багато їх в клітинах Купфера і ендотелії центральних вен часточок. Інші досліджені структури печінки експресують рецептори лектину рицини у великих кількостях.

3. При гепатиті не залежно від періоду розвитку хвороби кількість RCA-позитивних біополімерів статистично достовірно знижується **(додаток 1)**. Вони зникають з гепатоцитів і ендотелія синусоїдних гемокапілярів часточок. Зменшується кількість в клітинах Купфера, ендотелії центральних вен і судин тріад і епітелії стінки жовчних проток тріад.

4. Перший курс радонових ванн до кінця другого місяця статистично достовірно впливає на експресію біополімерів з вуглеводною детермінантою бета-D-галактози, екранованої сіалової кислотою, призводячи до збільшення їх кількості у всіх досліджених структурах печінки, за виключенням клітин і волокон пухкої сполучної тканини строми **(додаток 1)**. Після другого курсу радонових ванн кількість рецепторів лектину рицини ще збільшується, але не досягає рівня здорової печінки. Клітини і волокна пухкої сполучної тканини ці позитивні зміни не торкаються.

Перспективи подальших досліджень. Це подальше використання лектиногістохімічних, електронномікроскопічних та гістоморфометричних методів для досконалого вивчення патоморфогенезу і саногенезу АІГ без лікувальних препаратів.

Додаток 1

Порівняння по двохсторонньому Т-критерію Уілкоксона між вибірками кількісного вмісту рецепторів лектину рицини в структурах печінки щурів

	Число пар	Критичне значення	Значення по критерію	Характер вибірок
Гепатит в кінці п'ятого місяця експерименту				
Контрольна Группа	9	7	2	неоднорідні
Гепатит після двох курсів радонових ванн в кінці п'ятого місяця експерименту				
Гепатит в кінці п'ятого місяця експеримента	8		0	неоднорідні
Гепатит після одного курсу радонових ванн в кінці другого місяця експерименту				
Гепатит в кінці п'ятого місяця експеримента	7	3	0	неоднорідні

Список літератури

1. 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.
2. 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.
3. Волошин Н.А. Роль лектинов в диагностике и лечении злокачественных новообразований / Н.А.Волошин, С.Н. Пащенко // Запорожский мед. журнал. - 2004. - Т.24, № 3. - С.93-96.
4. Копійка І.В. Застосування гістохімічного методу визначення рецепторів до лектину PSA в ендометрії / І.В. Копійка, Ю.Б. Чайковський // Вісник морфології. - 2006. - Т.12, № 2. - С. 225-227.
5. Копійка І.В. Кількісний аналіз розподілу рецепторів лектинів у ендометрії / І.В. Копійка, Ю.Б. Чайковський // Львівський медичний часопис. - 2006. - Т.XII. - №3. - С. 61-65.
6. Луцик А.Д. Лектины в гистохимии / А.Д. Луцик, Е.С. Детюк, М.Д. Луцик. - Львов: Вища школа, 1989. - 144 с.
7. Соловьева Л. А. 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.
8. 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.
9. Хазанов А. И. Современные проблемы вирусных и алкогольних болезней печени / А. И. Хазанов // Рос. Журнал гастроэнтеролог., гематолог., колопроктол. – 2002. - №2. – С. 6-15.
10. Чайковський Ю.Б. Порівняльний лектиногістохімічний аналіз ендометрію в нормі, при гіперплазіях та аденокарциномах / Ю.Б. Чайковський, І.В. Копійка // Вісник проблем біології і медицини. - 2006. - Вип.2. - С.334-338.
11. Чайковський Ю.Б. Кількісне визначення рецепторів пектинів SNA, WGA, STA в ендометрії / Ю.Б. Чайковський, І.В. Копійка // Світ медицини та біології. - 2006. - № 3. - С. 82-86.
12. Чемоданова Е. И. Метод лектиногистохимии в дифференциальной диагностике красной волчанки / Е.И. Чемоданова, О.А. Притуло, Е.Ю. Шаповалова // Таврический медико-биологический вестник. -2003. – Т. 6, № 3. - С. 132 -133.
13. Brooks S.A. The involment of Helix pomatia lectin (HPA) binding N-acetylgalactosamine glycans in cancer progression / S.A. Brooks // Histol. Histopathol. - 2000. -Vol.15. - X2 1. -P.143-1 58.
14. Franceschini V. Histochemical study by lectin binding of surface glycoconjugates in the developing olfactory system of rat / V. Franceschini, M. Lazzari, K.P. Revoltella, F. Ciani // Int. J. Dev. Neurosci. – 1994. – Vol. 12, №3. – P. 197-206.
15. 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.

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

ЗАКОНОМІРНОСТІ ЗВ'ЯЗУВАННЯ ЛЕКТИНУ РИЦИНИ (RCA) СТРУКТУРАМИ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ З МОДЕЛЬОВАНИМ АВТОІМУННИМ ГЕПАТИТОМ ТА ПРИ ДІЇ ВОДНИМИ ТА РАДОНОВИМИ ВАННАМИ

Кисельова Т.М., Шаповалова О.Ю., Соловйова Л. О., Тереховська О. І., Харковенко Р. В.

Резюме. При визначенні RCA - позитивних сполучень виявлено раніше невідомі періоди перетворень структурних компонентів печінки щурів в 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 – гепатиту і гепатиту в умовах впливу на організм радонових процедур відображають певну послідовність включення різних механізмів патоморфогенеза та адаптації.

Ключові слова: глікополімери, глікокон'югати, лектин рицини (RCA), бензидинова позначка, автоімунний гепатит (АІГ), структури часточок і тріад, радон.

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

ЗАКОНОМЕРНОСТИ СВЯЗЫВАНИЯ ЛЕКТИНА КЛЕЩЕВИНЫ (RCA) СТРУКТУРАМИ ПЕЧЕНИ КРЫС С МОДЕЛИРОВАННЫМ АВТОИМУННЫМ ГЕПАТИТОМ И ПРИ ДЕЙСТВИИ ВОДНЫМИ И РАДОНОВЫМИ ВАННАМИ

Киселева Т.М., Шаповалова Е.Ю., Соловьева Л. О., Тереховская О. И., Харковенко Р. В.

Резюме. При определении RCA-положительных соединений выявлены до этого неизвестные периоды переобразований структурных компонентов печени крыс в норме, при АИГ, а также АИГ после двух курсов водных и радоновых ванных процедур: обнаруженные изменения гликоконьюгатов на поверхности и в цитоплазме клеток паренхимы и стромы печени под воздействием патологического процесса – гепатита и гепатита в условиях воздействия на организм радоновых процедур - отображают определенную последовательность включения разных механизмов патоморфогенеза и адаптации.

Ключевые слова: гликополимеры, гликоконьюгаты, лектин клещевины (RCA), бензидиновая метка, аутоимунный гепатит (АИГ), структуры долек и триад, радон.

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

Patterns Of Linkage Lectin (Rca) Structures Of Rat's Hepar With Modeling Autoimmune Hepatitis And At Action Water And Radon Baths

Kiseleva T.M., Shapovalova E.Yu., Solov'eva L. O, Terehovsky O.I, Kharkovenko R.V.

Summary. It was exposure unknown periods of transformations of the structural components of liver in norm by the detection of RCA -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 egtoplasme 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: glycopolimers, glycoconjugates, lectin (RCA), benzidineshifs, autoimmune hepatitis, structure of lobules and triads, radon.

Стаття надійшла 14.07.2011 р.