

Т.М. Матвейшина, М.А. Волошин

ЛЕКТИНІМУНОГІСТОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА СЕКРЕТУ КЕЛИХОПОДІБНИХ КЛІТИН ТА СЛИЗУ НОСОВОЇ ЧАСТИНИ ГЛОТКИ ЩУРІВ ЯК ІМУНОБІОЛОГІЧНОГО БАР'ЄРУ

Анотація

Неспецифічний імунний бар'єр глотки та слизу представлений рецепторами до лектинів. В роботі за допомогою лектингістохімічного метода вивчений розподіл залишків моносахаридів в секреті келихоподібних клітин та слизу носової частини глотки після внутрішньоутробної дії антигена. Встановлено, що у антигенпреміюваних новонароджених тварин спостерігається порушення вмісту вуглеводних залишків в секреті келихоподібних клітин міститься менше рецепторів до лектинів сочевиці та вики посівної, порівняно з тваринами інтактної групи, та практично не виявляються рецептори до лектину ікри окуня; а в слизу виявлено менше рецепторів до лектину вики посівної та ікри окуня, що вказує зміни неспецифічного лектинзв'язуючого бар'єру глотки.

Ключові слова: антиген, лектин, внутрішньоутробне антигенне навантаження, слиз, щури.

Вступ. Унікальність глотки, як імунорецепторного органу, що зазнає максимального антигенного навантаження та виконує імунорецепторну функцію, полягає в ознайомленні з антигенами лімфоїдної тканини, асоційованої зі слизовою, та заселенні антигенпреміюваними лімфоцитами інших органів. В літературі достатньо повно висвітлені дані стосовно морфогенезу дихальних шляхів [10, с. 109; 8, с. 102]. Водночас маловивченим залишається питання формування лімфоїдної тканини, асоційованої зі слизовими оболонками, в ранньому постнатальному періоді, а також після внутрішньоутробної дії антигенів. У випадку виникнення порушень у системі мати-плацента-плід відбувається інфікування плода висхідним шляхом або трансплацентарно. Слабкість первинної імунної відповіді плода сприяє розвитку патологічних станів, пов'язаних з можливим вторинним інфікуванням після народження, та переважно викликана внутрішньоутробним антигенним навантаженням будь-яким агентом [7, с. 80; 9, с. 45]. Внутрішньоутробне антигенне навантаження на плід призводить до передчасного виходу імунологічно незрілих Т-лімфоцитів, що містять рецептори до лектину арахісу, з тимусу та їх міграції до різних органів, в яких змінюються темпи формування морфофункціональних одиниць та місцевої лімфоїдної системи [2, с. 8; 3, с. 25]. Водночас важливим компонентом неспецифічного захисту є не тільки лімфоїдна тканина, асоційована зі слизовою оболонкою глотки, а й секрет келихоподібних клітин та слиз носової частини глотки. Тому вивчення розподілу рецепторів до лектинів в секреті носової частини глотки є важливим питанням.

Мета роботи. Описати розподіл рецепторів до лектинів арахісу, сої сочевиці, вики посівної, бузини чорної та ікри окуня в слизу та секреті келихоподібних клітин слизової носової частини глотки щурів після внутрішньоутробної дії антигена.

Матеріали та методи. Об'єктом дослідження було обрано 178 білих лабораторних щурів на 1, 3, 7, 14, 21, 45, 90 добу постнатального життя. Тварини поділені на чотири групи: I група – інтактні, тваринам II групи на 18-ту добу датованої вагітності внутрішньоплідно введено антиген, тваринам III групи на 18-ту добу датованої вагітності введено антиген в навколоплідні води, тваринам IV групи (контроль) на 18-ту добу датованої вагітності введено внутрішньоплідно фізіологічний розчин у відповідній дозі. Не залежно від способу введення, антенатальне антигенне навантаження впливає на розвиток плода. Плід заковтує до 1/3 об'єму навколоплідних вод за добу, отже введення антигену в навколоплідні води призводить до потрапляння його до травного тракту, отже його дія буде пролонгованою. В якості антигену було використано спліт-вакцину Ваксігрип для профілактики грипу інактивовану рідку, що містить гемаглютиніни вірусних штамів грипу в сумарній дозі 45 мкг. При роботі з експериментальними тваринами дотримувались міжнародних принципів Хельсінкської декларації Всесвітньої медичної асоціації про гуманне ставлення до тварин та Закону України „ Про захист тварин від жорстокого поводження ” (N 1759-VI від 15.12.2009). Матеріал фіксували у рідині Буена. Гістологічну обробку матеріалу проводили стандартним методом. Для морфофункціональної характеристики слизу та секрету келихоподібних клітин використовували лектингістохімічний метод виявлення кінцевих вуглеводних залишків за допомогою лектинів з використанням стандартних наборів «Лектинтест». Виявлення вуглеводних залишків β -D-галактози проводили з використанням лектину арахісу (PNA), залишків N-ацетил-D-галактозаміну – лектину сої (SBA), залишків α -D-манози – лектини сочевиці (LCA) та вики посівної (VSA), залишків ацетилнейрамін-D-галактози – лектину бузини чорної (SNA), залишків β -L-фукози – лектину ікри окуня (PFA). Облік результатів реакції з кон'югатами лектинів проводили напівкількісно при імерсійному збільшенні мікроскопа: +++ - темно-коричневе забарвлення, ++ - коричневе забарвлення, + - світло-коричневе забарвлення, - - відсутність реакції, що представлено в табл. 1, 2.

Результати досліджень та їх обговорення. У щурів всіх досліджуваних груп протягом перших двох тижнів життя в слизу носової частини глотки спостерігається поступове збільшення кількості рецепторів до лектину арахісу від світло-коричневого на 1 добу життя до темно-коричневого забарвлення. Описаний рівень інтенсивності забарвлення зберігається до 90 доби життя (табл. 1). Щільність розподілу рецепторів до лектину арахісу в секреті келихоподібних клітин на першу добу життя у тварин всіх досліджуваних груп однакова. Однак у тварин, яким внутрішньоутробно введено антиген на 3 добу життя секрет забарвлюється більш інтенсивно, порівняно з тваринами інтактною групи. Більш інтенсивне накопичення сполук з рецепторами до лектину арахісу

виявлено починаючи з 14 доби життя і надалі. Різниця між досліджуваними групами не нівелюється на кінець експерименту (табл. 2).

Таблиця 1

Інтенсивність забарвлення слизу носової частини глотки в нормі та після внутрішньоутробної дії антигена

Лектин	Групи тварин	Доба після народження та інтенсивність забарвлення						
		1	3	7	14	21	45	90
PNA	I	+	++	++	+++	+++	+++	+++
	II	+	++	++	+++	+++	+++	+++
	III	+	++	++	+++	+++	+++	+++
	IV	+	++	++	+++	+++	+++	+++
SBA	I	++	±	±	+	±	±	±
	II	++	+	+	+ / +++	+	+	±
	III	++	+	+	+ / +++	+	+	±
	IV	++	±	±	+	±	±	±
VSA	I	+	±	+	±	±	- / ±	- / ±
	II	±	±	++	±	±	±	±
	III	±	±	++	±	±	±	±
	IV	+	±	+	±	±	- / ±	- / ±
LCA	I	+	±	++	±	±	±	- / ±
	II	+	±	+++	- / ±	+	+	- / ±
	III	+	±	+++	- / ±	+	+	- / ±
	IV	+	±	++	±	±	±	- / ±
PFA	I	±	±	+	+	- / ±	±	±
	II	- / ±	+ / +++	++	+	- / ±	+	±
	III	- / ±	+ / +++	++	+	- / ±	+	±
	IV	±	±	+	+	- / ±	±	±
SNA	I	++	++	++	±	+	+	±
	II	++	+	+	+	+	±	±
	III	++	+	+	+	+	±	±
	IV	++	++	++	±	+	+	±

Примітки: I- інтактні тварини, II – тварини, яким внутрішньоплідно введено антиген, III – тварини, яким антиген введено в навколоплідні води, IV – контроль.

У новонароджених тварин всіх досліджуваних груп після постановки реакції з лектином сої, слиз забарвлюється в коричневий колір. Починаючи з 3 та до 45 доби життя, щільність розподілу залишків N-ацетил-D-галактозаміну більше у антигенпремійованих тварин порівняно з контролем (табл. 1). Інтенсивність забарвлення секрету келихоподібних клітин вище протягом перших 45 діб життя у тварин, яким внутрішньоутробно введено антиген, порівняно з тваринами інтактної групи (табл. 2). До 90 доби життя різниця між досліджуваними групами нівелюється.

Інтенсивність забарвлення секрету келихоподібних клітин носової частини глотки в нормі та після внутрішньоутробної дії антигена

Лектин	Групи тварин	Доба після народження та інтенсивність забарвлення						
		1	3	7	14	21	45	90
PNA	I	+++	+	+++	++/+++	++/+++	++/+++	++/+++
	II	+++	+/+++	+++	+++	+++	+++	+++
	III	+++	+/+++	+++	+++	+++	+++	+++
	IV	+++	+	+++	++/+++	++/+++	++/+++	++/+++
SBA	I	+	±	±	+	±	±	±
	II	+/+++	+	+	+/+++	+	+	±
	III	+/+++	+	+	+/+++	+	+	±
	IV	+	±	±	+	±	±	±
VSA	I	+	±	+	±	±	-/±	-/±
	II	±	±/-	++	±	±	±	±
	III	±	±/-	++	±	±	±	±
	IV	+	±	+	±	±	-/±	-/±
LCA	I	+	±	++	±	±	±	-/±
	II	±/+	-/±	+++	-/±	+	+	-/±
	III	±/+	-/±	+++	-/±	+	+	-/±
	IV	+	±	++	±	±	±	-/±
PFA	I	±	±/+	±	+	-/±	±	±
	II	-/±	+	+	+/+++	-/±	+	±
	III	-/±	+	+	+/+++	-/±	+	±
	IV	±	±/+	±	+	-/±	±	±
SNA	I	++	++	++	±	+	±	-/±
	II	++	+	+	+	+/±	±/-	-/±
	III	++	+	+	+	+/±	±/-	-/±
	IV	++	++	++	±	+	±	-/±

Примітки: I- інтактні тварини, II – тварини, яким внутрішньоплідно введено антиген, III – тварини, яким антиген введено в навколоплідні води, IV – контроль.

Лектин сочевиці та лектин вики посівної є D-манозоспецифічними лектинами. Для кращого розділення глікопротеїнів та глікопептидів використовують лектин сочевиці, який краще преципітує α_2 -макроглобулін, IgM. З лектином вики посівної взаємодіють не лише залишки D-манози, а й залишки D-глюкози [1]. На першу добу життя у тварин, яким внутрішньоутробно введено антиген, спостерігається зменшення щільності рецепторів до лектину вики посівної в слизу, порівняно з тваринами інтактної групи. На 7 добу життя у експериментальних тварин спостерігається збільшення інтенсивності накопичення залишків α -D-манози порівняно з контролем. Протягом інших термінів спостереження значущої різниці між показниками тварин досліджуваних груп немає.

Динаміка розподілу рецепторів до лектину сочевиці в слизу подібна до описаної, однак на відміну від неї інтенсивність забарвлення слизу на 1 добу

життя однакова у тварин всіх досліджуваних груп (табл. 1). Накопичення сполук з рецепторами до лектину вики посівної та сочевиці в секреті келихоподібних клітин менше протягом перших 3 днів життя у антигенпремійованих тварин порівняно з тваринами інтактної групи, з подальшим збільшенням на 7 добу життя. Починаючи з 14 доби життя значущої різниці між показниками тварин досліджуваних груп немає (табл. 2).

В слизу та секреті келихоподібних клітин новонароджених тварин, яким внутрішньоутробно введено антиген, виявлено зменшення інтенсивності накопичення рецепторів до лектину ікри окуня, порівняно з тваринами інтактної групи. Однак протягом періоду 3 – 7 доби життя вміст залишків β -L-фукози в слизу експериментальних тварин збільшується порівняно з контролем (табл. 1, 2).

На першу добу життя вміст рецепторів до лектину бузини чорної в слизу та секреті келихоподібних клітин однаковий у тварин всіх досліджуваних груп. Однак протягом 3 – 7 доби життя кількість залишків ацетилнейрамін-D-галактози менше у антиген премійованих тварин, порівняно з контролем, з подальшим збільшенням до 14 доби життя (табл. 1, 2).

Згідно з даними літератури, в муцині слизу виявлено п'ять залишків моносахаридів: фукози, галактози, N-ацетилглюкозаміну, N-ацетилгалактозаміну та сілової кислоти [6]. У інтактних новонароджених тварин секрет келихоподібних клітин містить значну частку залишків β -D-галактози, N-ацетилгалактозаміну, сілових кислот, мало залишків α -D-манози та D-глюкози; залишки L-фукози практично не виявляються. В антигенпремійованих тварин у секреті келихоподібних клітин міститься менше залишків α -D-манози, порівняно з тваринами інтактної групи та практично не виявляються залишки L-фукози. У новонароджених тварин інтактної групи слиз носової частини глотки містить вуглеводні залишки β -D-галактози (+), N-ацетилгалактозаміну (++)), α -D-манози та D-глюкози (+ - після постановки реакції з лектином вики посівної та з лектином сочевиці), L-фукози (\pm) та сілові кислоти (++)). В експериментальних тварин у слизі міститься менше рецепторів до лектину вики посівної (\pm) та ікри окуня (забарвлення практично відсутнє). Надалі в інтактних тварин у слизі носової частини глотки щільність рецепторів до лектину арахісу та сої збільшується до 14 доби життя, щільність рецепторів до вики посівної та сочевиці зменшується на 3 добу життя з подальшим підвищенням на 7 добу та наступним зниженням. Вміст сілових кислот лишається високим до 7 доби життя, після чого починає поступово знижуватися до 90 доби життя. Частка залишків L-фукози поступово збільшується до 7 доби життя з подальшим зниженням до 90 доби життя. В антигенпремійованих тварин частка вуглеводних залишків β -D-галактози та N-ацетилгалактозаміну поступово зменшується до 14 доби життя подібно до тварин інтактної групи, динаміка вмісту рецепторів до манозоспецифічних лектинів подібна до такої в контролі, однак на 7 добу життя щільність рецепторів до лектинів вики посівної та сочевиці перевищує показник контролю. Вміст сілових кислот у експериментальних тварин починає знижуватися з 3 доби життя і до 90 доби життя стає на рівні інтактних тварин. З

З до 7 доби життя кількість залишків L-фукози в слизі носової частини глотки експериментальних тварин вище, порівняно з тваринами інтактною групи, з 14 доби життя результат зрівнюється та поступово знижується до 90 доби життя.

Зміни лектинімуногістохімічної характеристики слизу та секрету келихоподібних клітин відбуваються на тлі збільшення кількості келихоподібних клітин, що описано нами раніше [4, с. 26]. Згідно концепції «Лімфоцит – фактор морфогенезу», внутрішньоутробне антигенне навантаження призводить до передчасного виходу імунологічно незрілих Т-лімфоцитів, що містять рецептори до лектину арахісу, з тимусу та їх міграції до слизової носової частини глотки [4, с. 61] та змін темпів формування морфофункціональних одиниць та місцевої лімфоїдної системи, що показано нами в попередній роботі [5, с. 25]. Вказані зміни впливають не тільки на направленість направленості морфогенезу глотки, а й призводять до змін складу залишків моносахаридів її секрету. В слизу рецептори до лектинів, особливо манозоспецифічних, виконують функцію опсонізації мікроорганізмів. Зменшення їх може сприяти порушенню бар'єру та погіршення адгезії мікроорганізмів, що містять на своїй мембрані відповідні вуглеводні залишки, особливо манозоспецифічні.

ВИСНОВКИ

У тварин, які внутрішньоутробно отримали антиген, незалежно від способу введення, змінюється лектингістохімічна характеристика секрету келихоподібних клітин та слизу носової частини глотки, що є свідченням порушення неспецифічного імунного бар'єру слизової оболонки глотки та може бути сприятливим фактором для впливу патогенних мікроорганізмів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Антонюк В. О. Лектини та їх сировинні джерела / В. О. Антонюк. – Львів : Кварт, 2005. – 554 с.
2. Внутриутробная антигенная стимуляция как модель для изучения морфогенеза органов / Н. А. Волошин, Е. А. Григорьева, О. Г. Куш, М. С. Щербаков [и др.] // Морфологические ведомости. – 2006. – № 1-2, прил. № 1. – С. 57–59.
3. Внутрішньоутробне введення антигенів - модель для вивчення ролі лімфоцитів в процесах морфогенезу внутрішніх органів / М. А. Волошин, О. А. Григор'єва, О. Г. Куш [та ін.] // Запороз. мед. журн. – 2005. – № 3 (30). – С. 25.
4. Волошин М. А. Динаміка PNA⁺- та SBA⁺-лімфоцитів в слизовій оболонці глотки щурів в постнатальному періоді після внутрішньоутробної дії антигена / М. А. Волошин, Т. М. Матвейшина // Укр. мед. альманах. – 2012. – Т. 15, № 5 (додаток). – С. 60–62.
5. Волошин М. А. Постнатальна динаміка клітинного складу епітелію слизової оболонки носоглотки після пренатальної дії антигена в експерименті / М. А. Волошин, Т. М. Матвейшина // Клінічна анатомія та оперативна хірургія. – 2012. – Т. 11, № 4. – С. 22–28.
6. Зеленев П. В. Секреторный иммуноглобулин А, как фактор местной защиты слизистой дыхательных путей и причины его снижения [Електронний

ресурс]. – Режим доступу : <http://aspirans.com/sekretorny-immunoglobulin-kak-faktor-mestnoi-zashchity-slizistoi-dykhatelnykh-putei-i-prichiny-ego>.

7. Куц О. Г. Методика вивчення популяції $\gamma\delta$ -Т-лімфоцитів із використанням панелі лектинів / О. Г. Куц, М. А. Волошин // Вісник морфології. – 2010. – № 16 (1). – С. 76–81.

8. Макар Б. Г. Сучасні погляди на морфогенез і топографо-анатомічні взаємовідношення гортані в ранньому онтогенезі людини : (огляд літ.) / Б. Г. Макар, О.-М. В. Попелюк, К. І. Яковець // Буковинський мед. вісник. – 2009. – Т. 13, № 2. – С. 100–103.

9. Мислицький В. Ф. Взаємозалежність між кількістю імунокомпетентних клітин та системним імунітетом у дітей із внутрішньоутробною або постнатальною інфекціями / В. Ф. Мислицький, Н. В. Гребенюк // Клінічна анатомія та оперативна хірургія. – 2009. – Т. 8, № 3. – С. 41–48.

10. Сирцов В. К. Морфофункціональна характеристика утворення лімфоїдних структур гортані людини в постнатальному періоді онтогенезу / В. К. Сирцов, К. С. Волков, О. І. Потоцька // Світ медицини та біології. – 2009. – № 2. – С. 108–110.

Стаття надійшла до друку: 24.09.2015 р.

*Т.М. Матвейшина, к.мед.н., асистент,
М.А. Волошин, Заслужений діяч науки та техніки України,
д.мед.н., професор*

ЛЕКТИНІМУНОГІСТОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА СЕКРЕТУ КЕЛИХОПОДІБНИХ КЛІТИН ТА СЛИЗУ НОСОВОЇ ЧАСТИНИ ГЛОТКИ ЩУРІВ ЯК ІМУНОБІОЛОГІЧНОГО БАР'ЄРУ

Глотка є унікальним імунорецепторним органом, що зазнає максимального антигенного навантаження та виконує імунорецепторну функцію, яка полягає в ознайомленні з антигенами лімфоїдної тканини, асоційованої зі слизовою, та заселенні антигенпреміюваними лімфоцитами інших органів. Неспецифічний імунний бар'єр глотки та слизу представлений рецепторами до лектинів. В роботі за допомогою лектингістохімічного метода вивчений розподіл залишків моносахаридів в секреті келихоподібних клітин та слизу носової частини глотки після внутрішньоутробної дії антигена. Встановлено, що у антигенпреміюваних новонароджених тварин спостерігається порушення вмісту вуглеводних залишків: в секреті келихоподібних клітин міститься менше рецепторів до лектинів сочевиці та вики посівної, порівняно з тваринами інтактною групи, та практично не виявляються рецептори до лектину ікри окуня; а в слизу виявлено менше рецепторів до лектину вики посівної та ікри окуня, що вказує зміни неспецифічного лектинзв'язуючого бар'єру глотки.

Ключові слова: антиген, лектин, внутрішньоутробне антигенне навантаження, слиз, щури.

*Т.Н. Матвейшина, к.мед.н., асистент,
Н.А. Волошин, Заслуженный деятель науки и техники Украины,
д.мед.н, профессор*

ЛЕКТИНИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СЕКРЕТА БОКАЛОВИДНЫХ КЛЕТОК И СЛИЗИ НОСОГЛОТКИ КРЫС КАК ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКОГО БАРЬЕРА

Глотка является уникальным иммунорецепторным органом, получающим максимальную антигенную нагрузку и выполняющим иммунорецепторную функцию, которая заключается в ознакомлении с антигенами лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистой и заселении лимфоцитами других органов. Неспецифический иммунный барьер глотки и слизи представлен рецепторами к лектинам. В работе с помощью лектингистохимического метода изучено распределение остатков моносахаридов в секрете бокаловидных клеток и слизи носоглотки после внутриутробного введения антигена. Установлено, что у новорожденных антигенпремированных животных наблюдается нарушение содержания углеводных остатков: в секрете бокаловидных клеток содержится меньше рецепторов к лектинам чечевицы и вики посевной, по сравнению с животными интактной группы, и практически не выявляются рецепторы к лектину икры окуня; в слизи содержится меньше рецепторов к лектину вики посевной и икры окуня, что указывает на изменение неспецифического лектинсвязывающего барьера глотки.

Ключевые слова: антиген, лектин, внутриутробная антигенная нагрузка, слизь, крысы.

T.M. Matveishyna, doctor of philosophy, assistant professor

*M.A. Voloshyn, honored scientist and technician of Ukraine, doctor of medicine,
professor*

LECTINIMMUNOHISTOCHEMICAL SECRET CHARACTERISTICS OF GOBLET CELL'S SECRET AND MUCUS OF RAT'S NASOPHARYNX AS IMMUNOBIOLOGICAL BARRIER

The pharynx is a unique immunoreceptor organ, gets the maximum antigen and executing the function immunoreceptor, which is to familiarise with antigen of lymphatic tissue that are associated with mucus and settlement of other organs with lymphocytes. Nonspecific immune barrier of the pharynx and mucus presents lectin's receptors. In the work with lectin histochemical method, we studied the distribution of the residues of monosaccharides in the secret of goblet cells and mucus of the nasal part of the pharynx after antenatal antigen action. Found that at the experiment in newborns there is a violation of the content of the carbohydrate residues in the secret of the goblet cells contained fewer receptors to lectins lentils and vicia sativa, compared with control group animals, and practically not found receptors to lectins caviar perch; in the mucus contains less lectin receptors to the vicia sativa and caviar perch, indicating that nonspecific changes lectin associate barrier pharynx.

Key words: antigen, lectin, antenatal antigen, mucus, rats.

Опубліковано:

Матвейшина Т. М. Лектинімуногістохімічна характеристика секрету келихоподібних клітин та слизу носової частини глотки щурів як імунобіологічного бар'єру / Т. М. Матвейшина, М. А. Волошин // Актуальні питання медичної науки та практики : зб. наук. пр. ДЗ «ЗМАПО МОЗ України». – Запоріжжя, 2016. – Вип. 83. – Т. 1, кн. 1. – С. 12-19.