

УДК 581.162.1:612.335]: [611.34.018.7+611.61–018]].08

© Коллектив авторов, 2013

## ПРИМЕНЕНИЕ ЛЕКТИНА ЗАВЯЗИ ПШЕНИЦЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ОСОБЕННОСТЕЙ СИНТЕЗА СЕКРЕТОРНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА А В ЭПИТЕЛИИ ТОНКОЙ, ТОЛСТОЙ КИШКИ И КЛЕТКАМИ НЕФРОНА

**Н. А. Волошин, А. Л. Лазарик, А. А. Светлицкий, С. В. Чугин, Н. Г. Гончарова**

*Кафедра анатомии человека, оперативной хирургии и топографической анатомии (зав. - д. мед. н., проф. Волошин Н. А.), Запорожский государственный медицинский университет. 69035 Украина, г. Запорожье, проспект Маяковского, 26. E-mail: vnvloshin@mail.ru*

### APPLICATION OF WHEAT GERM AGGLUTININ TO STUDY A FEATURES OF SECRETORY IMMUNOGLOBULIN A SYNTHESIS IN SMALL AND LARGE INTESTINE EPITHELIUM, AND CELLS OF THE NEPHRON

**N.A. Voloshin, A.L. Lazaryk, A.A. Svetlytsky, S.V. Chuhyn, N.G. Goncharova**

#### SUMMARY

It's well-known that degree of protection from local viral infections respiratory system, gastrointestinal and genitourinary tracts, depends on the content in the body of secretory IgA. This article proposed to use o Wheat germ agglutinin to study features of the secretory IgA synthesis in the epithelium of the small and large intestine, as well as rat kidney nephron in the early postnatal period (from 1–60 days of life).

### ЗАСТОСУВАННЯ ЛЕКТИНІВ ЗАРОДКІВ ПШЕНИЦІ ДЛЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ СИНТЕЗУ СЕКРЕТОРНОГО ІМУНОГЛОБУЛІНУ А В ЕПІТЕЛІЇ ТОНКОЇ, ТОВСТОЇ КИШКИ І КЛІТИНАМИ НЕФРОНА

**Н. А. Волошин, А. Л. Лазарік, А. О. Світлицький, С. В. Чугін, Н. Г. Гончарова**

#### РЕЗЮМЕ

Загальновідомим є той факт, що ступінь захисту від локальних вірусних інфекцій респіраторного, шлунково-кишкового трактів і сечостатевої системи, перш за все, залежить від вмісту в організмі секреторного ІgА. У роботі запропоновано використання лектину зародків пшениці (Wheat germ agglutinin- (WGA)) з метою вивчення особливостей синтезу секреторного ІgА в епітелії тонкої і товстої кишки, а так само у нефронах нирок щурів в ранньому постнатальному періоді (з 1–60 добу життя).

**Ключевые слова:** секреторный IgA, лектин зародышей пшеницы, эпителиальные клетки, гранулы.

Ни для кого не секрет, что степень защиты от локальных вирусных инфекций респираторно-го, желудочно-кишечного трактов и мочеполовой системы, прежде всего, зависит от содержания в организме секреторного IgA. Стабильная структура, выраженный аффинитет к поверхности слизистых оболочек, преобладающее содержание в секрете молочной железы обуславливают биологическую роль секреторного IgA в защите организма от неблагоприятного воздействия различных патогенных агентов, в том числе вирусов.

Известно, что IgA синтезируется в димерной форме в клетках lamina propria и после связывания с иммуноглобулиновым рецептором, синтезированным в эпителиальных клетках, транспортируется на поверхность слизистой оболочки (Туманов А. В., 2004). В момент выхода IgA в просвет кишечника рецептор частично расщепляется, в результате чего в составе IgA остается фрагмент рецептора, который называют секреторным компонентом. Таким образом, секреторный IgA является продуктом кооперации двух типов клеток — плазматических и эпителиальных.

В паренхиме почки синтез IgA может осуществляться мезенгиальными клетками и эпителиоцитами канальцев нефрона. Известно, что

в первые годы жизни у человека и в первые месяцы жизни крыс проксимальные извитые канальцы могут выполнять функцию подобную тонкой кишки.

Секреторный IgA образуется не только в димерной, но и в тетрамерной форме, что усиливает его вируснейтрализующую способность. Секреторный компонент предохраняет IgA от расщепления протеолитическими ферментами, что обуславливает его значительные преимущества перед антителами других классов. Секреторный IgA нейтрализует вирус не только в просвете кишечника, но и при транспортировке его внутрь клетки. Димер IgA способен нейтрализовать вирус в подслизистой основе оболочки кишечника, а затем, связавшись с рецептором, транспортировать его в просвет кишечника. Кроме того, около 90% плазматических клеток в lamina propria эпителия кишки продуцируют IgA, в то время как в лимфатических узлах доля таких клеток составляет всего 2–5%.

Лектин завязи пшеницы (Wheat germ agglutinin- (WGA)) селективно связывается с секреторным компонентом IgA. Поэтому появление WGA<sup>+</sup> гранул в эпителии толстой и тонкой кишки может свидетельствовать о нахождении секреторного компонента данного иммуноглобулина в данных клетках, что может помочь более глубокому изучению гуморального звена иммунной системы.

Также, в последнее время, особый интерес представляют дефензины — мелкие антимикробные пептиды, обладающие широким спектром активности в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, грибов и оболочечных вирусов. б- и в-дефензины человека расположены в гранулах нейтрофилов, макрофагов, НК-клеток, кишечинальной и эпителиальной ткани, клетках Панета, коже, слизистых респираторного, урогенитального и пищеварительного трактов, в биологических жидкостях. Кроме прямого антимикробного действия, дефензины обладают способностью регулировать хемотаксис, оказывать иммуномодулирующий, противоопухолевый и другие эффекты. Подтвержденные биологические эффекты регуляторных пептидов в экспериментальной и клинической медицине открывают новые возможности в лечении социально значимых заболеваний — таких как вирусный гепатит, туберкулез, рак, вторичные иммунодефициты.

Цель исследования: описать распределение WGA<sup>+</sup> гранулы в эпителии тонкой и толстой кишки, а также в проксимальных канальцах нефрона почки на ранних сроках после рождения в норме и после внутриутробного введения антигена.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования была двенадцатиперстная, тонкая и толстая кишки, а также почки белых крыс линии Вистар на 1-е, 3-е, 7-е, 11-е, 14-е, 21-е, 30-е, 45-е и 60-е постнатальной жизни. Возрастные группы установлены расчетным путем (Г. А. Добровольский, 1984 г.). Крыс содержали в виварии соответственно рекомендациям Ю. Н. Кожемякина и др. В работе исследованы 3-и группы животных: первая группа — интактные крысы, вторая — крысы, которым вводили физиологический раствор NaCl, в те же сроки, что и экспериментальным животным, третья группа — экспериментальные животные, которым внутриплодно вводили человеческий иммуноглобулин. Внутриутробное введение антигена осуществлялось плодам на 18-е сутки внутриутробного развития, оперативным путем (Волошин М. А., 1981 г.). Забой животных проводили путем декапитации. Кусочки кишки и почки фиксировали в жидкости Буэна, проводили в восходящей концентрации спиртов и заливали в воск-каучук-парафин. Готовились серийные срезы, толщиной 5–6 мкм. Для выявления структур, фенотипически различающихся по углеводным остаткам проводили исследования с использованием лектина пшеницы (WGA<sup>+</sup>) в стандартных наборах «Лектингест» (Львов). Обработку срезов производили конъюгатом лектин пшеницы — пероксидаза хрена (WGA<sup>+</sup>-HRP). Для выявления использовали раствор 3,3-диметилбензидина. Учет результатов реакции с конъюгатами лектина пшеницы WGA<sup>+</sup> проводили полуколичественно при имерсионном увеличении микроскопа (об.90, ок.10): ++ — темно-коричневая

окраска (позитивная реакция), + — светло-коричневая окраска — слабо позитивная реакция), 0 — отсутствие реакции.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В рамках концепции «Лимфоцит — фактор морфогенеза», в процессе изучения морфо-функциональных особенностей эпителия различных отделов тонкой и толстой кишки крыс, а также извитых канальцев почки в норме и после введения антигенов установлено, что в эпителии данных структур наблюдается накопление WGA-положительных включений. Включения тонкой кишки локализуются преимущественно в клетках крипты, и их количество уменьшается по мере перемещения из крипты в ворсинку. Внутри клетки включения локализуются диффузно или ближе к апикальной части клетки. При постановке реакции лектина завязи пшеницы с пероксидазой хрена (WGA-HRP) и обработкой срезов бензидином установлено, что включения приобретают темно-коричневую окраску, что свидетельствует о резко положительной реакции. В норме появление WGA-положительных гранул в эпителиальных клетках подвздошной кишки крыс отмечается на 3–7 сутки после рождения, достигает максимума на 14-е сутки и уменьшается к 60-м суткам жизни. У животных, которым в плодном периоде онтогенеза вводили антиген, появление гранул можно обнаружить уже в первые сутки после рождения, их содержание несколько выше, чем у интактных животных и сохраняется увеличенным до 60-х суток постнатального развития. В проксимальном отделе тонкой кишки (двенадцатиперстная кишка) в криптах, популяция клеток с WGA<sup>+</sup> — гранулами определяется, начиная с третьих суток после рождения. Клетки большие по размерам, локализуются в криптах и в базальных частях ворсинок тонкой кишки. Цитоплазматические включения, также как и в подвздошной кишке, располагаются в цитоплазме клеток диффузно. Количество клеток, содержащих гранулы, уменьшается по мере смещения из крипты в ворсинку. На верхушках ворсинок эпителиоцитов с WGA<sup>+</sup> — гранулами в цитоплазме не обнаружено.

В толстой кишке крыс (слепой и восходящей ободочной), как у интактных, так и экспериментальных животных накопление WGA-позитивных гранул, также как и в тонкой кишке наблюдается в клетках крипт. Гранулы так же, как и в тонкой кишке имеют выраженную положительную реакцию, локализуются диффузно в цитоплазме или в апикальной части клетки. Однако в отличие от тонкой кишки гранулы выявляются, начиная с 14-х суток жизни, и сохраняются до 60-х суток постнатального развития включительно. В почке интактных крыс, WGA-положительные гранулы обнаруживаются в проксимальных извитых канальцах нефрона, также как и в эпителиальных клетках кишки крыс с 3–7х суток после рождения, достигают максимума на 14-е сутки и уменьшают-

ся к 60-м суткам жизни. У антигенпремированных животных, данные гранулы выявляются уже с первых суток после рождения, их содержание также выше, чем у интактных животных и сохраняется увеличенным до 60-х суток постнатального развития.

Природа WGA<sup>+</sup>-гранул активно обсуждается. Изначально ранее описанные WGA<sup>+</sup>-гранулы в клетках эпителия крипты и нефрона мы расценивали как элементы становления внутриклеточных структур на ранних сроках после рождения, которые в своей структуре имеют остатки N-ацетил-D-глюкозамина и сиаловой кислоты, выявляемые лектином пшеницы. Однако, в толстой кишке, наибольшее количество выявленных гранул приходится на 14-е сутки жизни, что не согласуется с вышесказанным. Наличие гранул в эпителии кишки и проксимальных извитых канальцах нефрона почки может свидетельствовать о процессах расщепления и всасывания белков, что характерно для почки на ранних сроках (К. А. Зуфаров, 1970). Однако введение антигена не оказывает влияние на процессы внутриклеточного пищеварения, что не соответствует установленному в работе увеличению количества гранул после введения антигена.

Также, учитывая выявленную локализацию гранул в эпителии кишки и канальцах почки можно предположить образование дефензинов. По данным А. С. Будихиной (2008 г.), дефензины расположены в эпителиальных покровах кишки и почки именно в местах обнаружения нами WGA<sup>+</sup>-положительных гранул, но точных данных о локализации дифензина в клетке, а также его взаимодействия с лектином пшеницы нет, кроме того, дефензины являются элементом неспецифической защиты и введение антигена не должно влиять на их количество.

Учитывая расположение и сроки появления, мы склонны думать, что выявленные нами гранулы, вероятнее всего, относятся к процессам образования секреторного компонента IgA. Максимальное количество IgA в клетках эпителия тонкой и толстой кишки находится в эпителиоцитах крипты, постепенно уменьшаясь по направлению к ворсинке тонкой кишки, что соответствует данным Р. В. Петрова (1986 г.), относительно синтеза и секреции IgA. Кроме того, полученное нами увеличение содержания этих гранул, со второй недели после рождения в эпителии тонкой и толстой кишки, и проксимальных канальцев почки, позволяет предположить о начале процессов образования секреторного компонента IgA, на высоте формирования гуморального иммунитета, что согласуется с данными И. В. Нестеровой (2002 г.)

## ВЫВОДЫ

В эпителии тонкой, толстой кишки, канальцах почки процесс секреции WGA<sup>+</sup> веществ начинается на первой неделе после рождения, достигает максимума к 14-м суткам и остается стабильным до 60-х суток.

WGA<sup>+</sup> структуры синтезируются в базальных отделах эпителиоцитов, которые расположены только в криптах, где под базальной мембраной находятся В-лимфоциты.

После внутриутробного введения иммуноглобулина, WGA<sup>+</sup> структуры в эпителиоцитах выявляются на неделю раньше по сравнению с интактными и контрольными животными.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бернік Н. В. Морфологія людини і лектингістохімія/Бернік Н. В., Олійник І. Ю., Лаврів Л. П.// Клінічна та експериментальна патологія. — 2010. — Т. 9, № 3 (33). — С. 138–143.
2. Будихина А. С. Дефензины — мультифункциональные катионные пептиды человека/А. С. Будихина, Б. В. Пинегин//Имунопатология, аллергология, инфектология. — Москва, 2008. — № 2. — С. 31–40
3. Волошин М. А. Внутриутробная антигенная стимуляция как модель для изучения морфогенеза органов/М. А. Волошин, Е. А. Григорьева, М. С. Щербаков//Морфологические ведомости. — Уфа, 2006. — № 1–2, прил. № 1. — С. 57–59.
4. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними/Кожемякін Ю. М., Хромов О. С., Філоненко М. А., Сайфетдінова Г. А. — К.: Авіценна, 2002. — 156 с.
5. Нестерова И. В. Особенности строения и функционирования иммунной системы желудочно-кишечного тракта/И. В. Нестерова, И. Н. Швыдченко//Аллергология и иммунология. — 2002. — Т. 3, № 2. — С. 282–292.
6. Петров Р. В. Иммунология/Р. В. Петров. — М.: Медицина, 1982. — 368 с.
7. Ройт А. Основы иммунологии: пер. с англ./А. Ройт. — Мир, 1991. — 287 с.
8. Туманов А. В. Развитие вторичных лимфоидных органов/А. В. Туманов//Иммунология. — 2004. — № 2. — С. 120–128.
9. Хаитов Р. М. Иммунная система желудочно-кишечного тракта: особенности функционирования в норме и при патологии/Р. М. Хаитов, Б. В. Пинегин//Иммунология. — 1997. — № 5. — С. 4–7.