

УДК 611.12:611.013.8:572.7

В.В. Кошарний, Л.В. Абдул-Оглы

## ГЕТЕРОГЕННОСТЬ СВЯЗЫВАНИЯ ЛЕКТИНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ КАРДИОГЕНЕЗА И ПЛАЦЕНТЫ

Днепропетровская государственная медицинская академия (г. Днепропетровск)

Исследование проведено в рамках договора о научно-техническом сотрудничестве между Днепропетровской государственной медицинской академией и Львовским национальным медицинским университетом имени Даниила Галицкого.

Исследование является фрагментом плановой научной работы кафедры анатомии человека Днепропетровской государственной медицинской академии: «Морфогенез сердца та судин при експериментальних втручаннях» (номер державної реєстрації 0106U12193).

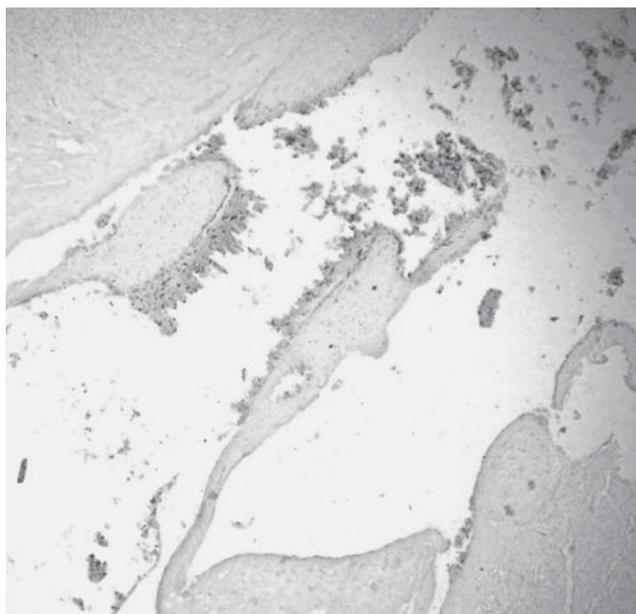
**Вступление.** В исследованиях медицинской эмбриологии, особенно при исследованиях кардиогенеза и развития плаценты, когда происходят процессы септации сердца и формирования ранней плаценты, а также морфологические превращения эмбриональных структур, происходит перераспределение углеводных молекул и рецепторов лектинов на поверхности клеток, одной из наиболее показательных характеристик которых есть склонность к адгезии и миграции [5, 6]. Без этих процессов невозможно представить те изменения, которые возникают в сигмовидном сердце и обеспечивают не только перестройку органа в четырехкамерный, но и принимают участие в формировании клапанного аппарата, а также формирования трёх видов ворсин хориона ранней плаценты, в основе которых лежат эпителиально-мезенхимальные превращения, подтверждаемые лектиногистохимическими методами исследования [2, 3, 9]. По мнению большинства авторов, все цитологические процессы, а также механизмы формирования межклеточных контактов происходят при участии надмембранного клеточного комплекса – гликокаликса, в состав которого входят углеводные компоненты с разными биохимическими характеристиками [1, 8]. Современными гистохимическими маркерами гликоконъюгатов клеток является лектины, которые с высокой избирательностью связываются с остатками гликополимеров: гликозаминогликанами и гомогликанами, представителем которых является гликоген [4]. На последовательных этапах гисто- и морфогенеза в составе клеток и тканей разных видов животных и человека происходят постоянные перестройки лектин-рецепторных систем. Лектин-рецепторные системы высоко видо- и тканеспецифические и являются тонкими тестами развития ткани в норме [7].

**Цель исследования:** определение состава и распределения рецепторов лектинов миграции и адгезии в тканях сердца и плаценты человека.

**Объект и методы исследования.** Материалом исследования стали 18 сердец и плацент чело-

века на ранних этапах кардиогенеза от 6 до 16 недели пренатального развития. Полученные сердца фиксировали нейтральным формалином и заливали в парафиновые блоки согласно общепринятых методик. Серийные срезы после депарафинизации опускали в 96 градусный этанол, а затем для инактивации эндогенной пероксидазы инкубировали 20 минут в метаноле, который содержит 0,3% перекиси водорода. Препараты обрабатывали с применением стандартных наборов НПК «Лектинотест» м. Львов в разведении лектина 1:50 за рекомендованную методикой. В процессах адгезии клеток принимают участие рецепторы лектинов, что содержат конечные остатки D-галактозы, потому нами использовались лектины виноградной улитки (HPA), специфические к N-ацетил-D-галактозамину. Рецепторы, которые обнаруживают способность к миграции клеток определялись по результатам накопления лектинов бузины черной (SNA), специфических к конечным нередуцированным остаткам N-ацетилгалактозаминовой (сиаловой) кислоты гликополимеров. Интенсивность расцветки срезов разными лектинами оценивалась в баллах методом полуколичественной оценки.

**Результаты исследований и их обсуждение.** В наших исследованиях мы исследовали гистопографию рецепторов лектинов в эмбриональных структурах сердца и ранней плаценты человека на основе проведенных лектиногистохимических исследований. К рецепторам лектинов относятся углеводсодержащие молекулы такие, как гликопротеины, протеогликаны, гликолипиды, гликозаминогликаны. Применение наборов лектинов различной углеводной специфичности позволяет получить информацию о перераспределении углеводсодержащих молекул в процессе развития и с возрастом. Благодаря избирательности связывания отдельных лектинов с различными клетками можно дифференцировать отдельные субпопуляции морфологически одинаковых клеток. Появление одних рецепторов, интернализация или маскирование других генетически детерминированы и определяют тип клетки, направление её дифференциации и дальнейшую судьбу. Лектины WGA хорошо окрашивали апоптотические клетки в сердце эмбрионов, мезенхиме клапанного аппарата и ворсинах хориона ранней плаценты. SNA связывался с внеклеточным матриксом, обогащённым кислыми гликозаминогликанами. Эспрессия рецепторов лектинов LABA со специфичностью к D-Л-фукозы наибольшей определялась в участке тканей атриовентрикулярного канала сердца (рис.1).

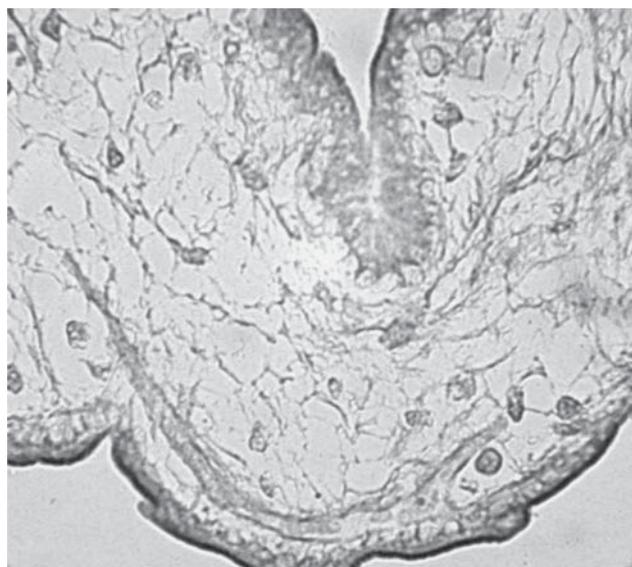


**Рис. 1.** Срез атриовентрикулярного канала сердца эмбриона человека 6-7 недели пренатального развития (первичные створки атриовентрикулярных клапанов). Интенсивный цвет накапливают ткани, которые обнаруживают рецепторы к Д-Л-фукозе (лектин LAVA) золотого дождя. Увеличение: ок.8 X об.10.

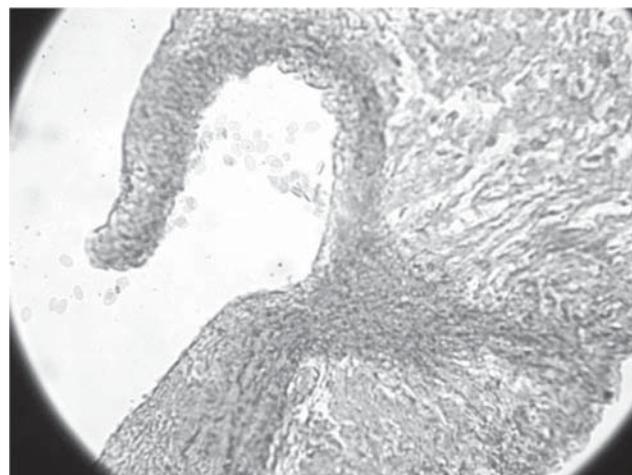
Эти рецепторы одновременно располагались в разных тканях отмеченной области эмбрионального сердца, но уровень накопления их был различным, а именно: первичных створках (уровень накопления определяли как +++), сухожильных струнах (+++) и сосцевидных мышцах (++) . Как известно, эти структуры в сердце имеют достаточно разное происхождение, разные структурные компоненты и клеточный состав, и подлежат выраженным морфогенетическим изменениям во время кардиогенеза. Первичные створки предсердно-желудочковых клапанов состоят из остатков мезенхимы эндокардиальных подушек и покрыты слоем эндокарда. Первичная сухожильная струна является результатом процесса деляминации (расслоение стенки желудочка) и состоит из миокардиальных клеток и тонкого слоя эндокарда. Первичная сосцевидная мышца является частью миокарда желудочка, которая отделена в результате дегисценции (отщепления миокардиального тяжа клеток миокарда желудочков). Общей у этих структур является только функция и недостаточное кровоснабжение на ранних этапах кардиогенеза.

В норме и при нарушении формирования плаценты экспрессия рецепторов лектинов LAVA со специфичностью к Д-Л-фукозе выявили высокую степень сродства во вторичной и третичной ворсинах хориона ранней плаценты человека к клеткам макрофагальной системы – клеткам Кащенко-Гофбауэра, что указывает на участие этой углеводной детерминанты в процессах синтеза и секреции биологически активных веществ и ферментативных систем этих клеток (рис.2). В

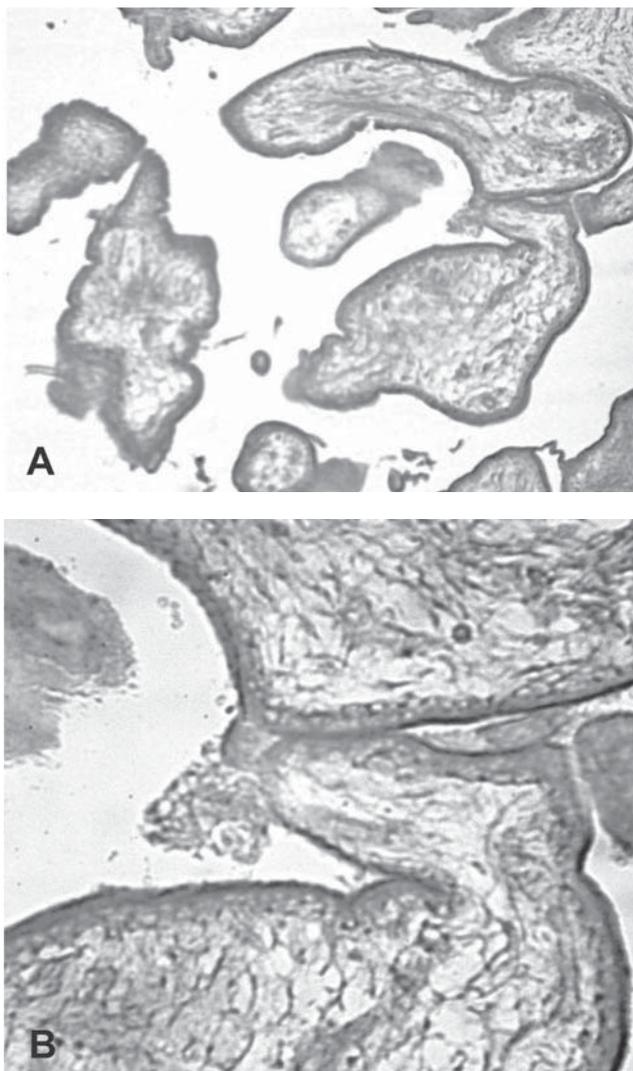
связи с тем, что процессы миграции и адгезии на клеточном уровне происходят параллельно, как единственный процесс разных частей клетки, связанный с возможным передвижением клетки, исследования рецепторов к лектинам виноградного слизня (HPA) и лектинам бузины черной (SNA) тоже проводились и оценивались одновременно. Анализ распределения маркеров показал, что степень связывания мезенхимных клеток из SNA в толще эндокардиальных подушек предсердно-желудочкового канала на 6-7 неделе (рис.3), и вторичных, третичных ворсин хориона на 4-5-й неделе пренатального развития (рис.4 А, В) достаточно разный.



**Рис. 2.** Срез ворсин хориона ранней плаценты человека 4-5 ти недель пренатального развития. Интенсивный цвет накапливают клетки Кащенко-Гофбауэра и эпителиально-мезенхимальный тяж, которые обнаруживают рецепторы к Д-Л-фукозы (лектин LAVA) золотого дождя. Увеличение: ок.8 X об.40.



**Рис. 3.** Срез атриовентрикулярного канала сердца эмбриона человека 6-7 недели пренатального развития. Стрелкой обозначен тяж клеток, которые обнаруживают рецепторы лектина черной бузины (SNA). Увеличение: ок.8 X об.40.



**Рис. 4.** Срез ворсин хориона ранней плаценты эмбриона человека 4-5 недели пренатального развития. Интенсивный цвет накапливают участки тканей, которые обнаруживают рецепторы лектина черной бузины (SNA) и стрелкой обозначен эпителиально-мезенхимальный тяж клеток, которые обнаруживают рецепторы лектина черной бузины (SNA). А-Увеличение: ок.8 X об.10. В-Увеличенный фрагмент рис.4-А: ок.8 X об.40.

Среди общего массива мезенхимных клеток, которые наполняют объем эндокардиальных подушек, вторичных и третичных ворсин хориона на данном этапе развития формируется пул клеток, в которых рецепторы к лектинам черной бузины (SNA) оказываются в значительно высшей степени (уровень накопления (+++)). Наибольшая плотность рецепторов к SNA в целом органе определялась в эндокарде и эпикарде эмбрионального сердца, цитотрофобласте ворсин хориона, а также сосудах сердца и ранней плаценты, которые развиваются.

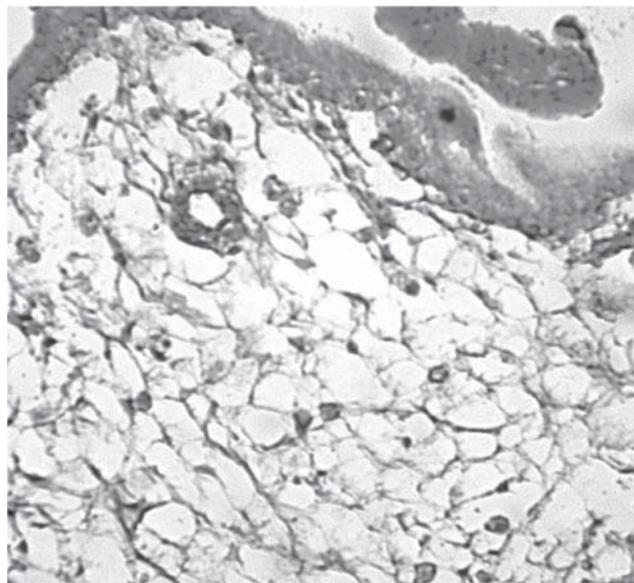
Как и в исследованиях с появлением рецепции к лектинам черной бузины (SNA), так и в формировании рецепторов НРА выявления плотности этих рецепторов определялось в эндокарде и эпи-

карде, а также в цитотрофобласте ворсин хориона. Накопление обоих видов отмеченных лектинов происходило именно в тех участках тканей, которые были особо склонны к миграционным процессам. Наши исследования эмбрионального сердца показали, что такими участками являются пулы мезенхимных клеток эндокардиальных подушек предсердно-желудочкового канала и вторичных ворсинок хориона ранней плаценты человека.

Нами была определена гетерогенность связывания лектина зародышей пшеницы (WGA) в тканях разных участков эмбрионального сердца и ворсин хориона.

Специфическая локализация разных рецепторов лектинов свидетельствует об их функциональной значимости в процессах кардиогенеза и формирования плаценты. Накопление лектинов зародышей пшеницы (WGA) происходило именно в тех участках тканей, где протекали активно гистогенетические процессы.

В исследованиях выявления рецепторов специфичных к N-ацетилглюкоз-аминогликанам лектина зародышей пшеницы (WGA) характерным было наличие значительного количества равномерно расположенных рецепторов к WGA на плазматических мембранах многих клеток миокарда, мезенхиме клапанного аппарата и ворсин хориона ранней плаценты. Наибольшая степень накопления (+++) наблюдалась в эндотелии сосудов (как сформированных так и таких, которые закладываются), эндокарде и эпикарде оболочек стенки сердца человека и в третичных ворсинках хориона ранней плаценты (рис.5).



**Рис. 5.** Срез ворсин хориона ранней плаценты эмбриона человека 4-5 недели пренатального развития. Интенсивный цвет накапливают участки тканей, которые обнаруживают рецепторы к N-ацетилглюкоз-аминогликанам лектина зародышей пшеницы (WGA) и стрелкой обозначен эндотелий сосудов. Увеличение: ок.8 X об.40.

**Выводы.** Таким образом, в результате вышеизложенного мы сделали вывод, что специфическая локализация разных рецепторов лектинов свидетельствует об их функциональной значимости в процессах формообразования сердца и плаценты и накопление отмеченных лектинов происходит именно в тех участках тканей, которые особо активны к процессам миграции и адгезии. Применение наборов лектинов различной углеводной специфичности позволяет получить информацию о перераспределении углеводсодержащих молекул в процессе развития и с возрастом. Благодаря избирательности связывания отдельных лектинов с различными клетками можно дифференцировать отдельные субпопуляции морфологически одинаковых клеток. Появление одних рецепторов, интернализация или маскирование других генетически детерминированы и определяют тип клетки, направление её дифференциации и дальнейшую судьбу. Исследования с помощью лектиногистохимических маркеров в наших исследованиях продемонстрировало, что на 4-8-м неделях развития происходит перераспределение углеводных молекул и рецепторов лектинов на поверхности клеток, что объясняет гетерогенность связывания лектинов миграции SNA, адгезии WGA и LABA в тканях плаценты и сердца человека. При нарушении формирования плаценты накопление лектинов в этих участках происходило значительно медленнее.

**Перспективы дальнейших исследований.** Дальнейшее изучение кардиогенеза человека при влиянии повреждающих факторов на базовые гистогенетические процессы представляется пер-

спективным с использованием иммуногистохимических методов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волошин Н.А. Лектины животного и растительно-го происхождения: роль в процессах морфогенеза / Н.А.Волошин, Е.А.Григорьева // Теоретична медицина.- 2005, т.11, № 2.- С.223-237.
2. Василенко И.В. Эпителиально-мезенхимальная и другие трансформации в норме / [Василенко И.В., Брук Б.Б., Гульков Ю.К., Кондратюк Р.Б., Запороженко Н.В., Шукина Е.В.] // Патологія -2009.Т.6. – № 2.– С.4-10.
3. Давиденко І.С. Використання теорії інформації для оцінки структурної організації різних типів хоріальних ворсин плаценти при фізіологічній вагітності / І.С. Давиденко // Вісник морфології.-2005.-Т.11, № 1.–С.5-10.
4. Ермакова И.И. Протеогликаны внеклеточного матрикса миобластов L 6 J 1. Характеристика и влияние на адгезию / [Ермакова И.И., Чертова Е.Ф., Мокрушин Л.А., Романюк А.В., Сакута Г.А., Морозов В.И.] // Цитология, 2008. Т.50, №8.- С.692 – 699.
5. Лутай Н.В. Гистотопография рецепторов лектинов в тканях 10-недельного эмбриона человека / [Лутай Н.В., Машталір М.А., Бразалук А.З., Твердохлеб И.В.] // Вісник проблем біології і медицини.- 2004.- № 3.- С.104-107.
6. Луцик А.Д. Лектины в гистохимии / А.Д.Луцик, Е.С.Детюк, М.Д.Луцик. - Львов: Вища школа, 1989.- 140 с.
7. Машталір М.А. Вплив етанолу та ретиноевої кислоти на лектин-гістохімічні властивості клітинної поверхні в серці мишачих зародків / М.А. Машталір // Вісник проблем біології і медицини.- 2005.- № 4.- С.147-150.
8. Хулуп Г. Я. Предшественники эндотелиальных клеток: характеристика и роль в сердечно-сосудистой патологии / Г.Я. Хулуп, Н.В. Ламовская // Медицина.- №4.- 2008.- С. 10-14.
9. Lectin histochemistry of the chick embryo during embryonic days 3-8 / [M.Mashtalir, N.Lutay, A.Brazaluck, I.Tverdokhlebl] // Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska.- Lublin, Polonia, 2004.- Vol. XVII, № 2, section DDD.- P. 269-271.

**УДК** 611.12: 575.16 – 029.9

#### ГЕТЕРОГЕННІСТЬ ЗВ'ЯЗУВАННЯ ЛЕКТИНОГІСТОХІМІЧНИХ МАРКЕРІВ КАРДІОГЕНЕЗУ ТА ПЛАЦЕНТИ

**Кошарний В.В., Абдул-Огли Л.В.**

**Резюме.** Для вивчення вуглеводної специфічності клітинних мембран у серці ембріонів людини дослідили розподіл рецепторів до лектинів кори бузини чорної (SNA) та виноградного равлика (HPA), зародків пшениці (WGA) та лектину золотого дощу (LABA). Дослідження проведено на 18 препаратах сердець ембріонів людини від 6 до 16 тижнів пренатального розвитку. Підготовку зрізів та етапи реакції проводили за загальноприйнятими методиками. Виборча гетерогенність з'вязування лектинів SNA та HPA, WGA та LABA у ткани різних ділянок ембріонального серця людини, демонструє процеси міграції клітин та їх осілості. Специфічна локалізація різних рецепторів лектинів говорить об їх функціональній значимості у процесах формоутворення серця як органа. В ендокардіальних подушках визначаються тяжи мезенхімних клітин, які мають більше рецепторів до лектинів SNA. В атриовентрікулярному каналі визначаються накопичення клітин, які мають більше рецепторів до лектинів LABA.

**Ключові слова:** кардіогенез, лектини, гистотопографія.

**УДК** 611.12: 575.16 – 029.9

#### ГЕТЕРОГЕННОСТЬ СВЯЗЫВАНИЯ ЛЕКТИНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ КАРДИОГЕНЕЗА И ПЛАЦЕНТЫ

**Кошарный В.В., Абдул-Огли Л.В.**

**Резюме.** Для изучения углеводной специфичности клеточных мембран в сердце зародышей человека изучали распределение рецепторов к лектинам кори бузины черной (SNA) и виноградноулитки (HPA), завязей пшеницы (WGA) и лектина золотого дождя (LABA). Исследование проведено на 18 препаратах сердца эмбрионов человека от 6 до 16 недель пренатального развития. Подготовку срезов и этапы реакции проводили по общепринятым методикам. Определенная гетерогенность связывания лектинов SNA и HPA, WGA и LABA в тканях разных участков эмбрионального сердца человека, де-

монстрирует процессы миграции клеток и их оседлости. Специфическая локализация разных рецепторов лектинов свидетельствует об их функциональной значимости в процессах формообразования сердца как органа. В эндокардиальных подушках определяются тяжи мезенхимных клеток, которые имеют большее количество рецепторов к лектинам SNA. В атриоventрикулярном канале определяются массивы клеток, которые имеют большее количество рецепторов LABA.

**Ключевые слова:** кардиогенез, лектины, гистотопография.

**UDC** 611.12: 575.16 – 029.9

**HETEROGENEITY the USE of LECTINS is in RESEARCHES of CARDOIGENESIS RATS and PLACENTA**

**Koshanuy V. V., Abdul-Oglu L. V.**

**Summary.** For the study of carbohydrate specificity of cellular membranes in the heart of embryos of man studied distributing of receptors to lectins of bark of elder black (SNA) and vine grease iron (HPA), ovaries of wheat (WGA) and lectin of gold rain (LABA). Research is conducted on 18 preparations of heart of embryos of man from 6 to 16 week prenatal development. Preparation of cuts and stages of reaction was conducted after the generally accepted methods. Certain heterogeneity of fastening of lectins of SNA and HPA, WGA and LABA is in fabrics of different areas of embryo heart of man, that can control the processes of migration of cages and their settled way of life. Specific localization of different receptors of lectins testifies to their functional meaningfulness in the processes of formation of heart as organo. Pool of cages of mesenchymal cages which have a greater amount of receptors to lectins of SNA is determined in endocardial pillows. Are the arrays of cages which have a greater amount of receptors of LABA with specificity to determined in a atrioventricular channe.

**Key words:** cardogenesis, lectins, histotopography.

**УДК** 57.043: 611.018.51: 576.31

**В.В. Рамазанов, Т.И. Дейнеко, Е.Л. Воловельская, В.А. Коптелов, В.А. Бондаренко**

## **МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭРИТРОЦИТОВ, ЗАМОРОЖЕННЫХ В КОМБИНИРОВАННОЙ СРЕДЕ С НЕПРОНИКАЮЩИМ И ПРОНИКАЮЩИМ КРИОПРОТЕКТОРАМИ**

**Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков)**

Данная работа является фрагментом научной темы «Механизмы изменения осмотической и температурной чувствительности клеток при действии модификаторов цитоскелет-мембранного комплекса, амфифильных веществ и криопротекторов» (№ государственной регистрации 0104U006437).

**Вступление.** Эритроциты, замороженные в среде без криопротектора, имеют значительную степень повреждения, а оставшиеся клетки морфологически представлены сфероцитами, эхиноцитами и сфероэхиноцитами с миелиноподобными структурами от которых отделяются везикулы. Включение в среду замораживания декстрана обеспечивает предотвращение везикуляции и значительного гемолиза эритроцитов, при этом остаются клетки морфологически представлены в основном дискоцитами с невысоким содержанием эхиноцитов, что характерно для интактных эритроцитов [13]. Однако такие морфологические показатели отмечаются для клеток, которые не отмывались от декстрана по-

сле замораживания. Эритроциты, отмывые от криоконсерванта, являются осмотически хрупкими по сравнению с интактными клетками [13], что, вероятно, связано с изменением объемно-морфологических параметров клеток. Сочетание декстрана с проникающим криопротектором (ДМСО или глюкоза) в среде обеспечивает сохранение удовлетворительной осмотической хрупкости эритроцитов после их замораживания и отмывания от криоконсерванта [3]. Кроме того, комбинирование в среде поливинилпирролидона с 1,2-пропандиолом позволяет получить после замораживания эритроциты, которые приближаются по форме к дискоцитам и образуют «монетные столбики» при переносе их в плазму [1].

Таким образом, сочетание в криоконсерванте непроникающих и проникающих криопротекторов обеспечивает положительный эффект относительно сохранения формы и осмотической хрупкости эритроцитов после замораживания.