

DOI: 10.26693/jmbs03.04.194

УДК 611.313+616.313-056.52)-018:547.96

Нич Я. І., Ященко А. М., Луцик О. Д.

ЛЕКТИНОВА ГІСТОХІМІЯ СМАКОВИХ БРУНЬОК ЖОЛОБУВАТОГО СОСОЧКА ЯЗИКА ЩУРІВ В НОРМІ ТА ЗА УМОВ ГЛУТАМАТ-ІНДУКОВАНОГО ОЖИРІННЯ

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького, Україна

nych.yaryna@gmail.com

З використанням панелі з 6 лектинів різної вуглеводної специфічності (LABA, RCA, WGA, CNFA, CCRA, GNA) досліджували вплив натрієвої солі глутамінової кислоти на гістологію вуглеводних детермінант структурних компонентів слизової оболонки язика. Встановлено, що глутамат-індукована перебудова глікокон'югатів супроводжувалась повною або частковою редукцією термінальних залишків α LFuc, β DGal, DGlcNAc, NeuNAc та GalNAc β 1- \rightarrow 4GlcNAc, (LacdiNAc) у складі цитоплазми смакових рецепторних клітин та підтримувальних епітеліоцитів смакових бруньок, у поєднанні з накопиченням рецепторів лектинів RCA, WGA та CNFA у поверхневому шарі епітелію слизової оболонки язика. Зміна вуглеводного профілю під дією натрієвої солі глутамінової кислоти ймовірно спричиняє зміну проникності плазмолемі смакових рецепторних клітин, що призводить до зміни смакової чутливості. Виявлена редукція рецепторів лектинів LABA, RCA, WGA та CNFA у клітинному складі смакової ямки за умов глутамат-індукованого ожиріння може бути пов'язана зі зниженням секреції глікопротеїнів підтримувальними епітеліоцитами.

Ключові слова: ожиріння, язик, глікокон'югати, лектини.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота є фрагментом планової науково-дослідної теми кафедри гістології, цитології та ембріології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького «Лектино- та імуногістохімічний аналіз вуглеводних детермінант нормальних та патологічно змінених клітин і тканин», № державної реєстрації 0117U001076.

Вступ. За даними ВООЗ більше мільярда осіб на планеті мають надмірну масу тіла. На сьогодні проблема ожиріння набула статусу неінфекційної пандемії [2, 3]. За даними епідеміологічних досліджень, що були проведені в Україні, більш ніж половина дорослого населення має надмірну масу тіла, що безумовно пов'язано з низьким рівнем фізичної активності, особливостями харчової поведінки, зростанням в раціоні висококалорійних продуктів і

легкозасвоєваних вуглеводів, а також широким і безконтрольним використанням в харчовій промисловості та в мережі підприємств громадського харчування харчових добавок, перш за все, глутамату натрію [5, 7, 10]. Стимулюючи закінчення смакових нервів, глутамінова кислота та її солі підсилюють смакові відчуття, в результаті чого з'являється відчуття задоволення. Відомо, що глутамат натрію у вигляді харчової добавки викликає порушення обміну речовин та може бути однією з причин розвитку ожиріння і захворювання травного тракту [6]. Незважаючи на значне число робіт, присвячених даній проблемі, єдиної думки щодо безпечної дози поширеної харчової добавки – глутамату натрію немає [8, 9, 16]. Відомо, що порушення функціонального стану клітин призводить до зміни складу глікому, а це, у свою чергу, слугує одним з ранніх та об'єктивних ознак початку патологічного процесу. Багато дослідників вивчали експресію глікокон'югатів у клітинах смакових бруньок різних тварин з використанням методів лектинової гістохімії, як корисного інструменту для визначення вуглеводних детермінант клітинної поверхні. Лектини використовуються для ідентифікації конкретних популяцій клітин на основі різної спорідненості з різними вуглеводними епітопами поверхні клітинної мембрани, а також дозволяють вивчати динаміку перерозподілу глікокон'югатів у складі клітин та екстрацелюлярних структур як у фізіологічних умовах, так і при патології [11–15].

Мета дослідження. З використанням методів лектинової гістохімії дослідити вплив натрієвої солі глутамінової кислоти на вуглеводні детермінанти структурних компонентів жолобуватого сосочка язика.

Об'єкт і методи дослідження. Дослід проводили на 20 самцях лінії Вістар масою 180–200 г (у контрольній та дослідній групах по 10 тварин).

Утримання тварин та експерименти проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 2005), Закону України «Про

захист тварин від жорстокого поводження» (2006, ст. 26), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених П'ятим національним конгресом з біоетики (Київ, 2013). Дослідження здійснювалися згідно погодження Комісії з біоетики ЛНМУ імені Данила Галицького (Протокол № 2 від 15.02.2016 р.).

Експериментальна модель аліментарного ожиріння відтворювалась шляхом додавання до кормової суміші, яка включал стандартну їжу (47%), солодке концентроване молоко (44%), кукурудзяну олію (8%) та рослинний крохмаль (1%), індуктора харчового потягу – натрієвої солі глютамінової кислоти у співвідношенні 0,6:100,0 протягом 30 днів.

Статистичну обробку даних проводили за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Office Excel 2003 та STATISTICA. 6 (USA) [4] з визначенням "M" та середньої похибки "m". У роботі використовували рівень значущості * – $p < 0,001$, що відноситься до оцінки різниць значень маси.

Тварин виводили з експерименту шляхом передозування інгаляційного наркозу хлороформом. Гістологічний матеріал (язик) фіксували у суміші Буена, зневоднювали, ущільнювали і заливали у парафін. Для загальноморфологічного дослідження зрізи товщиною 5–7 μm зафарбовували гематоксиліном та еозином. Вуглеводні детермінанти досліджували з використанням панелі шести лектинів різної вуглеводної специфічності (табл.). Візуалізація рецепторів лектинів здійснювалась у системі

3,3-діамінобензидину тетрагідрохлориду (Sigma, США) у присутності пероксиду водню. Оцінку експонування рецепторів до лектинів проводили напівкількісним методом за інтенсивністю реакції з лектином.

Результати досліджень та їх обговорення. Показники, що отримані при вимірюванні параметрів тіла експериментальних тварин, підтверджують розвиток ожиріння у щурів, яким вводили натрієву сіль глютамінової кислоти до кормової суміші. Визначали індекс маси тіла – ІМТ (відношення маси тіла (г) щурів до квадрату довжини тіла (cm^2)). В контрольній групі тварин ІМТ становив $0,66 \pm 0,04 \text{ г/см}^2$, ІМТ дослідної групи – $0,75 \pm 0,03 \text{ г/см}^2$, $p < 0,001$. Довжина тіла тварин в контрольній та дослідній групах достовірно не відрізнялася.

Лектин LABA. У тварин контрольної групи експонування рецепторів фукозоспецифічного лектину спостерігалось у всіх шарах епітелію. У смакових бруньках жолобуватого сосочка найвищу афінність до лектину LABA демонстрували цитоплазматичні глікокон'югати смакових епітеліоцитів, тоді як у ядрах цих клітин кількість вуглеводних детермінант LFuc виявилась нижчою (рис. 1А). За умов глютамат-індукованого ожиріння виявлена тенденція до редукції зв'язування лектину як з клітинами смакової ямки, так і поверхневого шару епітеліальної пластинки, на тлі ареактивності базального шару (рис. 1Б).

Таблиця – Лектини та їх вуглеводна специфічність

Назва лектину	Джерело його отримання	Вуглеводна специфічність лектинів
LABA	Лектин кори золотого дощу (Laburnum anagyroides agglutinin)	αLFuc
RCA	Лектин рицини (Ricinus communis agglutinin)	βDGal
WGA	Лектин зав'язків пшениці (Triticum vulgare agglutinin)	DGlcNAc, NeuNAc
CNFA (CNL)	Лектин гриба грузлика димчастого (Clitocybe nebularis fungus agglutinin)	GalNAc β 1- \rightarrow 4GlcNAc, (LacdiNAc)
CCRA	Лектин ікри коропа (Cypripinus carpioe agglutinin)	DGalNAc
GNA	Лектин підсніжника (Galanthus normalivalis agglutinin)	αDMan

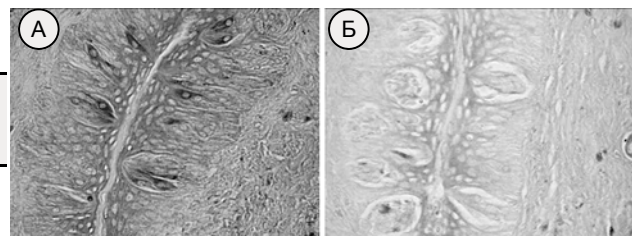


Рис. 1. Цитотопографія рецепторів лектину LABA у структурних компонентах жолобуватого сосочка: А – контроль, Б – дослід. Зб. x400

Лектин RCA. В тварин контрольної групи βDGal -специфічний лектин RCA виявляв високу спорідненість практично до всіх структур досліджуваного органа, проте найвищу афінність було задокументовано до смакових та підтримувальних клітин смакових бруньок (рис. 2А). За умов глютамат-індукованого ожиріння спостерігалась незначна редукція вуглеводних детермінант βDGal у смакових бруньках та деяке посилення експонування рецепторів цього лектину в поверхневому шарі покривного епітелію в порівнянні з контрольними зразками (рис. 2Б).

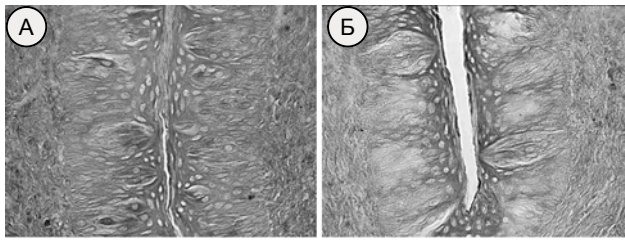


Рис. 2. Цитотопографія рецепторів лектину RCA у структурних компонентах жолобуватого сосочка: А – контроль, Б – дослід. Зб. х400

Лектин WGA в нормі виявляв селективне гістохімічне маркування з підвищеним експонуванням рецепторів лектину у складі цитоплазматичних глікокон'югатів рецепторних та підтримувальних епітеліоцитів смакових бруньок. У тварин контрольної групи всі шари епітелію жолобуватого сосочка демонстрували гомогенність зафарбовування з лектином зародків пшениці (**рис. 3А**) на відміну від дослідних зразків, де відзначалася певна гетерогенність у зв'язуванні лектину WGA з різними шарами епітелію. Висока концентрація рецепторів лектину WGA виявлена у цитоплазмі клітин поверхневого шару епітелію, реактивність клітин базального шару істотно не відрізнялася. За умов глутамат-індукованого ожиріння виявлено незначну редукцію глікозильних залишків в цитоплазмі клітин смакових бруньок (**рис. 3Б**).

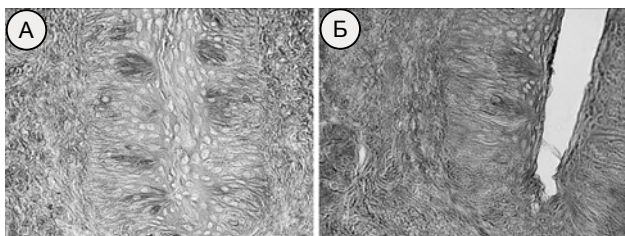


Рис. 3. Цитотопографія рецепторів лектину WGA у структурних компонентах жолобуватого сосочка: А – контроль, Б – дослід. Зб. х400

Лектин CNFA (CNL) виявляє вибіркочу специфічність до глікокон'югатів з вуглеводними детермінантами GalNAc β 1-4GlcNAc, (LacdiNAc) [1]. Спостерігалася позитивна реакція як з контрольними, так і з дослідними зразками, проте є певні відмінності розподілу рецепторів даного лектину серед структур епітелію язика. Високу афінність до означеного лектину було задокументовано у смакових та підтримувальних клітинах смакових бруньок у нормі (**рис. 4А**). У дослідній групі тварин реактивність епітелію була на порядок вищою ніж епітелій контрольної групи, проте клітини смакових бруньок виявляли певну редукцію лектинових рецепторів (**рис. 4Б**).

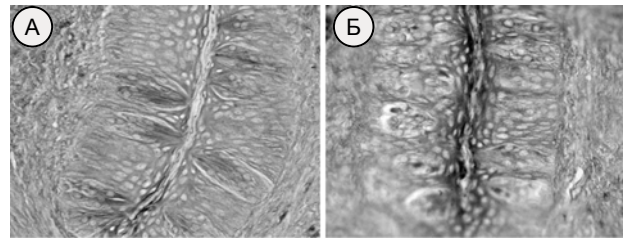


Рис. 4. Цитотопографія рецепторів лектину CNFA у структурних компонентах жолобуватого сосочка: А – контроль, Б – дослід. Зб. х400

Лектини CCRA та GNA демонстрували подібну специфічність зв'язування зі структурними компонентами жолобуватого сосочка. На тлі ареактивності смакових бруньок визначалась незначна афінність означених лектинів до поверхневого шару епітелію та власної пластинки слизової оболонки язика як в нормі так і за умов глутамат-індукованого ожиріння (**рис. 5**).

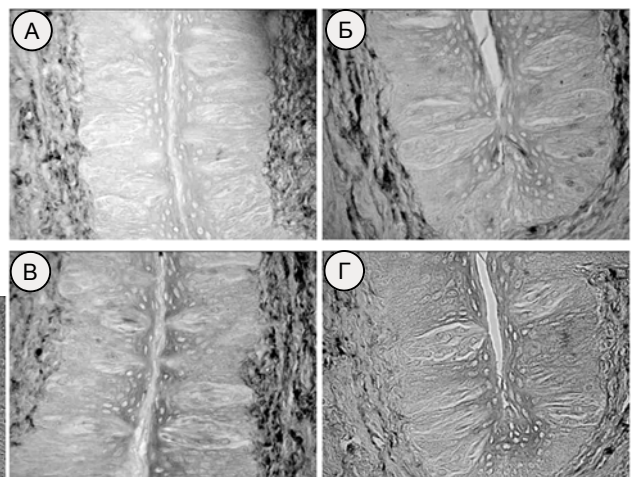


Рис. 5. Цитотопографія рецепторів лектинів CCRA: А – контроль, Б – дослід; та GNA: В – контроль, Г – дослід. Зб. х400

Висновки. Загалом глутамат-індукована перебудова глікокон'югатів структурних компонентів жолобуватого сосочка язика супроводжувалась повною або частковою редукцією рецепторів лектинів LABA, RCA, WGA та CNFA (термінальних залишків α LFuc, β DGal, DGlcNAc, NeuNAc та DGalNAc відповідно) у складі цитоплазми сенсорно-епітеліальних клітин та підтримувальних епітеліоцитів смакових бруньок, у поєднанні з накопиченням рецепторів лектинів RCA, WGA та CNFA в поверхневому шарі покривного епітелію. Оскільки глікопротеїни смакової ямки відіграють роль сорбентів для смакових речовин, зміна вуглеводного профілю під дією натрієвої солі глутамінової кислоти правдоподібно спричиняє зміну проникності

плазмолемі сенсорно-епітеліальних клітин, що може призводити до зміни смакової чутливості. Виявлена редукція рецепторів лектинів LABA, RCA, WGA та CNFA у клітинному складі смакової ямки за умов глутамат-індукованого ожиріння може бути пов'язана з зниженням секреції глікопротеїнів підтримувальними епітеліоцитами.

Перспективи подальших досліджень. У перспективі передбачається розширити панель лектинів різної вуглеводної специфічності, що дасть можливість більш повно інтерпретувати дані щодо перебудови вуглеводних детермінант клітинної поверхні на тлі глутамат індукованого ожиріння.

References

1. Antonyuk VO. *Lektyny ta yikh syrovynni dzherela*. Lviv: Kvart; 2005. 554 s. [Ukrainian].
2. Bentsa T. M. Diyetoterapiya ozhyrenyya. *Endokrynologiya*. 2012; 17 (1): 102-5. [Russian].
3. Vlasenko MV, Semenyuk IV, Slobodyanyuk GG. Tsukrovyy diabet i ozhyrinnya – epidemiya XXI stolittya: suchasnyy pidkhid do problemy. *Ukrayinskyy terapevtychnyy zhurnal*. 2011; 2: 50-5. [Ukrainian].
4. Gumenetsky RYa, Palyanytsya BM, Chaban MYe. *Matematychni metody v biologiyi: teoretychni vidomosti, programovanyy praktykum, komp'yuterni testy*. Lviv: Vyshcha shkola; 2004. 111 s. [Ukrainian].
5. Leshchenko IV, Shevchuk VG, Falalyeyeva TM, Beregova TV. Vplyv tryvalogo vvedennya glutamatu natriyu na strukturu pidshlunkovoyi zalozy shchuriv. *Fiziologichnyy zhurnal*. 2012; 58 (2): 59–65. [Ukrainian].
6. Rutska AV, Getsko NV, Krynytska IYa. Toksychnyy vplyv glutamatu natriyu na zhyvyi organizm (oglyad literatury). *Medychna ta klinichna khimiya*. 2017; 19 (1): 119-27. [Ukrainian].
7. Falaleeva TM, Samonyna GE, Beregovaya TV, Dzyubenko NV, Andreeva LA. Vlyyanye glyprolynov na strukturno-funktsionalnoe sostoyaniye slyzystoy obolochky zheludka y massu tela krysa v uslovyakh dlytel'nogo vvedeniya glutamata natriya. *Fyzyka zhyvogo*. 2010; 18 (1): 154–9. [Russian].
8. Freeman M. Reconsidering the effects of monosodium glutamate: a literature review. *Journal of American Academic Nurse Practice*. 2006; 18 (10): 482–6. PMID: 16999713. DOI: 10.1111/j.1745-7599.2006.00160.x
9. Geha R, Beiser A, Ren C, Patterson R, Greenberger P, Grammer L, et al. Review of alleged reactions to monosodium glutamate and outcome of a multicenter doubleblind placebo-controlled study. *Journal of Nutritional*. 2000; 130 (4S): 1058S-62S. PMID: 10736382.
10. He K, Zhao L, Daviglius M, Dyer A, Van Horn L, Garside D, et al. Association of monosodium glutamate intake with overweight in Chinese adults: the intermap study. *Obesity*. 2008; 16 (8): 1875-80. PMID: 18497735. PMCID: PMC2610632. DOI: 10.1038/oby.2008.274.
11. Kano K, Ube M, Taniguchi K. Glycoconjugate in rat taste buds. *J Vet Med Sci*. 2001; 63 (5): 505-9. PMID: 11411494. <https://doi.org/10.1292/jvms.63.505>.
12. Susumu Ohmura S. Lectin histochemical and ultrastructural study on the filiform papilla of the hamster tongue. *J Oral Biol*. 1988; 30 (1): 83-95. <https://doi.org/10.2330/joralbiosci1965.30.83>.
13. Taniguchi K, Koida A, Mutoh K. Comparative lectin histochemical studies on taste buds in five orders of mammals. *J Vet Med Sci*. 2008; 70 (1): 65-70. PMID: 18250574. <https://doi.org/10.1292/jvms.70.65>.
14. Witt M, Miller I. Comparative lectin histochemistry on taste buds in foliate, circumvallate and fungiform papillae of the rabbit tongue. *Histochemistry*. 1992; 98 (3): 173-82. PMID: 1452451. <https://doi.org/10.1007/BF00315876>.
15. Witt M, Reutter K. Lectin histochemistry on mucous substances of the taste buds and adjacent epithelia of different vertebrates. *Histochemistry*. 1988; 88: 453-61. PMID: 3259218.
16. Yang W, Drouin M, Herbert M, Mao Y, Karsh J. The monosodium glutamate symptom complex: assessment in a double-blind, placebo-controlled, randomized study. *Journal of Allergy Clinical Immunology*. 1997; 99 (6): 757–62. PMID: 9215242. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(97\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(97)80008-5).

УДК 611.313+616.313-056.52)-018:547.96

ЛЕКТИНОВАЯ ГИСТОХИМИЯ ВКУСОВЫХ ПОЧЕК ЖЕЛОБОВАТОГО СОСОЧКА ЯЗЫКА КРЫС В НОРМЕ И В УСЛОВИЯХ ГЛУТАМАТ-ИНДУЦИРОВАННОГО ОЖИРЕНИЯ

Нич Я. И., Яценко А. М., Луцик А. Д.

Резюме. Исследовали влияние натриевой соли глутаминовой кислоты на гистотопографию углеводных детерминант вкусовых сосочки языка крыс с использованием панели из 6 лектинов различной углеводной специфичности (LABA, RCA, WGA, CNFA, CCRA, GNA). Установлено, что глутамат-индуцированная перестройка гликоконъюгатов сопровождалась полной или частичной редукцией терминальных остатков αLFuc, βDGal, DGlcNAc, NeuNAc и GalNAcβ1-4GlcNAc, (LacdiNAc) в составе цитоплазмы вкусовых рецепторных клеток и поддерживающих эпителиоцитов вкусовых сосочков, а также накоплением рецепторов лектинов RCA, WGA и CNFA преимущественно в поверхностном слое эпителия слизистой оболочки языка. Изменение гликопрофиля под действием натриевой соли глутаминовой кислоты

может вызывать изменение проницаемости плазмолеммы вкусовых рецепторных клеток, что, вероятно, обуславливает изменение их вкусовой чувствительности. Обнаруженная редукция рецепторов лектинов LABA, RCA, WGA и CNFA в клеточном составе вкусовой ямки в условиях глутамат-индуцированного ожирения может быть обусловлена снижением секреции гликопротеинов поддерживающими эпителиоцитами.

Ключевые слова: ожирение, язык, гликоконъюгаты, лектины.

UDC 611.313+616.313-056.52)-018:547.96

Lectin Histochemistry of Taste Buds of the Rat Tongue Circumvallate Papilla under Normal Conditions and in Glutamate-Induced Obesity

Nych Ya. I., Yaschenko A. M., Lutsyk A. D.

Abstract. Sodium glutamate in the form of a dietary supplement causes metabolic disorders and can induce obesity and digestive tract diseases. *The purpose of the research* was to study the influence of sodium glutamate on the carbohydrate determinants of taste buds of the rat tongue using a set of 6 lectins with different carbohydrate specificities.

It is well known that violation of cellular homeostasis leads to changes in their glycode, which, in turn, serves as one of early and objective signs of the onset of pathological process. Lectins allow not only the identification of carbohydrate determinants of cell and tissue glycoconjugates, but also to study their redistribution in the dynamics of their exposure on plasma membranes, intra- and extracellularly under physiological and pathological conditions.

Material and methods. The experiment was conducted on 20 male rats weighing 180–200 g (10 control and 10 experimental). The experimental model of alimentary obesity was reproduced by adding an inducer of food consumption – sodium glutamic acid salt – in a ratio of 0.6: 100.0 to a high calories diet for 30 days. After determining body weight of experimental animal, it was calculated the weight of the feed mixture, which consisted of standard food (47%), sweet concentrated milk (44%), corn oil (8%), and vegetable starch (1%). Indicators obtained while measuring body's parameters of experimental animals confirmed the development of obesity in rats that were fed with sodium glutamate supplementation: the body mass index (BMI) in the control group animals was 0.66 ± 0.04 , while BMI of the experimental group animals was 0.75 ± 0.03 , $p < 0.001$. The body length of control and experimental group animals was not significantly different. Histological material (tongue) was fixed in Bouins fluid, dehydrated and embedded in paraffin.

Results and discussion. Carbohydrate determinants were detected by lectin-peroxidase technique using a set of 6 lectins: LABA (α LFuc specific), RCA (β DGal), WGA (DGlcNAc > NeuNAc), CNFA (GalNAc β 1->4GlcNAc, (LacdiNAc)), CCRA (DGalNAc), GNA (α DMan specific) with subsequent visualization of lectin receptor sites in diaminobenzidin-H₂O₂ medium. Microscopic investigation was performed using «Granum R6053» microscope, equipped with «Echoo-Imager 502502000» camera and the computer program «ToupView 3.7».

It was detected that glutamate-induced glycoconjugate rearrangement included substantial reduction of α LFuc, β DGal, DGlcNAc, NeuNAc and GalNAc β 1->4GlcNAc, (LacdiNAc) determinants in the cytoplasmic glycoconjugates of sensory and supportive cells of taste buds, which was accompanied by the accumulation of RCA, WGA and CNFA lectin receptor sites predominantly in the surface epithelial layer of lingual mucosa.

Conclusions. Changes of glycoprofile under the influence of sodium glutamic acid salt apparently cause subsequent changes in the permeability of the plasma membranes of sensory cells of taste buds, which is likely to change their taste sensitivity. The reduction of LABA, RCA, WGA and CNFA lectins receptor sites within the taste pores of rats affected with glutamate-induced obesity may be associated with the decreased secretion of glycoproteins by supportive epithelial cells.

Keywords: obesity, tongue, glycoconjugates, lectins.

Стаття надійшла 03.04.2018 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування