**Практична робота №3.**

**Оволодіння лектингістохімічним методом для вивчення міжклітинних контактів .**

В процесі морфогенезу, утворені тканин і органів, при ідентифікації свого від чужого включається складний механізм адгезивної взаємодії. Біологи виділили і ідентифікували багато молекулярних адгезинів, що відповідальні за клітинні процеси адгезії [12]. Класифікація рецепторів і лігандів клітинної адгезії стала визначальною подією в біології ссавців. Загальновідома догма (для клітин ссавців), що молекули клітинної адгезії поділяються на чотири групи.

1. Інтегрини – родина мембраних глікопротеїнів представлених α і β субодиницями. Обидві субодиниці зв´язуються з лігандом, а цитоплазматичний фрагмент інтегринів зв´язується зі цитоскелетом клітин. Інтегрини є рецепторами для білків міжклітинного матриксу. Вважається, що до складу інтегринів входить послідовність амінокислот (Arg-Gly-Asp=RGD), що також приймає участь у розпізнаванні. Субродини інтегринів відрізняються своєю будовою. Перша підродина - (CD29) – VLA білок, зв´язується з екстрацелюлярними матриксними білками – фібронектином, коллагеном і ламініном. Друга підродина - (CD18) – притамана лейкоцитам, що забеспечує циркуляцію лейкоцитів в тканинах. Третя підродина - (CD61) – цитоадгезин, притамана тромбоцитам і мегакаріоцитам [11].

2. Селектини – родина кальційзалежних мембраних глікопротеїнів. Вони були виявлені тільки на циркуюючих клітинах та ендотелію. LAM-1 (LECAM-1) експресуються на нейтрофілах, моноцитах і більшості лімфоцитах, полегшуючи їх зв’язування з ендотелієм під час рециркуляції і при еміграції під час запалення. Роллінг лейкоцитів до ендотелію через селектини відбувається опосередковано через β2- інтегрини і молекули MAC-1 за допомогою ICAM-1 [8].

3. Імуноглобулінова суперродина – різноманітна группа молекул. Прототипом данних рецепторів є імуноглобулін. N-CAM також є членом данної суперродини. Інші представники суперродини приймають участь у імунному розпізнавані [7].

4. Кадгерини – особлива родина молекул клітиної адгезії, без структурної гомології з іншими адгезивними молекулами [2]. Члени родини кадгеринів є кальційзалежними і з механізмом гомофільного зв´язування. Представники мають масивний позаклітиний домен.

Всі чотири класса адгезинів мають вуглеводний компонент, споріднений до специфічного лектину, який може бути лігандом для різних імунокомпетентних клітин.

На одній клітини можуть зустрічатися рецептори всіх чотирьох групп і поки до кінця не зрозуміло, чому клітини потребують великої кількості «липких» молекул і чи існують відмінності у фізичній силі зв´язування серед цих адгезинів. З іншого боку постає питання, як клітина захищається від спонтаної адгезії. На поверхні цитоплазматичної мембрани розташовується «частокіл» з рецепторів білково-вуглеводної природи, що створює значний стеричний бар´єр і посилює електростатичне відталкування. В доповненя до молекулярної шорсткості приєднується «топографічна» шорсткість, що виникає при скророчуванні цитоскелету клітини.

На сьогодня одним із відкритих питань імуноморфології, є вивчення механізмів адгезії між компонентами сполучної тканини і клітинами імунної системи.

Таким чином, **мета дослідження** – встановити роль вуглеводів у процесі адгезії між компонентами фібриноїду плаценти та імунокомпетентними клітинами.

**Матеріали і методи дослідження.** Матеріалом дослідження стали плаценти щурів. Було застосовано лектингістохімічний метод («Лектинтест», м. Львів). Для дослідження вуглеводів в біологічній адгезії досліджено будову фібриноїду плаценти і зв'язок компонентів фібриноїду із різними популяціями лімфоцитів.

Для специфічного виявлення вуглеводного компоненту фібрину, який має залишки сіалової кислоти використовували лектин кори бузини чорної (SNA) [5]. β1–інтегрин має вуглеводний компонент також споріднений до рецепторів лектину кори бузини чорної (SNA)[13]. Для виявлення танесцину – протеїну, що належать до складу фібриноїдних відкладань і виявляє велику спорідненість до фіколінів – лектинів які зв’язуються з N-ацетілглюкозаміновими залишками, ідентифікують по вуглеводними залишками лектину пшениці (WGA)[6]. До вуглеводів із кінцевими залишками ClcNac (WGA) проявляє тропність також білок аннексин [4]. αЕС домени фібриноїду є лігандами для вуглеводних компонентів білків плазматичних мембран клітин, тому по характеру лектинрецепторного профілю поверхні цитоплазматичної мембрани лімфоцитів, що виявляються в товщі фібриноїдних депозитів, можливо судити про селективну адсорбцію окремих субпопуляцій лімфоцитів [3]. Сорбція імуноглобулінів та імунних комплексів в фібриноїдних масах діагностується SBA+–відкладаннями, тому що вуглеводні залишки конститутивних фрагментів імуноглобулінів проявляють специфічність до лектину сої (SBA) [10]. Ламінин має вуглеводний компонент, що специфічно зв’язується з рецепторами Ulex europaeus (UEA) – лектином дроку европейского, який має вуглеводний залишок Fucal–2Gal та ідентичний лектину ікри окуня[14]. Специфічними маркерами до вуглеводного компоненту фібронектину є лектин арахісу (PNA), що має Galβ1–3GalNAcα залишки [9]. Інтерстиціальні колагени I і III типів мають у своєму складі глікопротеїни, вуглеводні залишки яких є спорідненими до лектину окуня Perca fluviatilis (PFA). Диференціювання колагену III типу проводили по виявленню рецепторів до лектину Perca fluviatilis з попереднім проведенням кислотного гідролізу по Qintarelli, з урахуванням кислотостійкості цього колагену. Колаген V типу визначали по наявності на його вуглеводних компонентах рецепторів до лектину Glicine max (SBA). Колаген VI типу диференціювали по наявності у його складі рецептору 1251, спорідненого до лектину Lens culinaris (LCA) [1].

**Результати дослідження і їх обговорення.** Вроботі досліджено вуглеводний компонент матриксного і фібринового типів фібриноїду.

Вуглеводна композиція, що входить до відкладань фібриноїду в материнських лакунах, в плодових судинах, на межі материнської і плодової частини плаценти та в децидуальній тканині відтворює імуноморфологічні взаємовідносини в системі мати−плацента−плід.

Маскування антигенів клітин трофобласта шаром сіалоглікопротеїдів блокує аферентну ланку імунної реакції з боку материнського організму, в той час як шар фібриноїда, що фіксує антитрофобластичні антитіла і сенсибілізовані лімфоцити матері і, таким чином, виключає еферентну ланку імунної відповіді. Зовнішня поверхня трофобласта, що складається з фібриноїду, стає замаскованою і одночасно адгезивною, що сприяє зв’язуванню біополімерними молекулами рецепторів лімфоцитів, з подальшою їх інактивацію і відміною розвитку імунологічніх реакцій з трофобластом.

Фібриноїд плаценти переважно складається із фібрину – глікопротеїну, у якого вуглеводна частина закінчується сіаловими кислотами, що є лігандами для лектину кори бузини чорної (SNA). Маскування рецепторів клітин трофобласту сіаловими кислотами захищає їх від різних руйнуючих факторів та є механізмом формування імунного неспецифічного бар’єру в плаценті. Одним із агресивних факторів по відношенню до клітин трофобласту є дія материнських цитотоксичних лімфоцитів лакунарної крові і децидуальної тканини, які завдяки своїм рецепторам проявляють тропність до рецепторів, що вміщують сіалові кислоти.

Тенасцин і аннексин V, що виявляються лектином пшениці, вибірково адгезують NK, В−лімфоцити, активовані Т−лімфоцити. Кількість та інтенсивність нашарувань WGA+−походження корелює із загальною кількістю лімфоцитів в децидуальній тканині і в шарі гігантських трофобластичних клітин. На випадок відсутності неспецифічного бар’єру фібринового походження на поверхні клітин трофобласту, імуноадсорбуючу функцію по відношенню до лімфоцитів виконують вуглеводні залишки рецепторів−інтегринів тенасцину і аннексину. Беручи до уваги, що у формуванні фібриноїду децидуальної тканини в меншій мірі приймає участь коагуляційна система материнської крові, ніж в походженні фібриноїду лабіринтного відділу, із−за більшої площі контакту материнської крові з тканинами трофобласту, можливо більш детально пояснити біологічну роль мембраноасоційованих WGA+−молекул тенасцину і аннексину в фібриноїдних композиціях материнських лакун. При відсутності неспецифічного бар’єру сформованого за рахунок відкладень фібриноїду фібринового походження на поверхні клітин трофобласту, адгезивну функцію по відношенню до Т−лімфоцитів виконують вуглеводні залишки рецепторів−інтегринів тенасцину і аннексину, які мають спорідненість до лектину пшениці.

Сорбція імуноглобулінів та імунних комплексів в фібриноїдних масах діагностується за SBA+−відкладаннями, тому що вуглеводні залишки конститутивних фрагментів імуноглобулінів проявляють специфічність до лектину сої (SBA). Таким чином, накопичення SBA+−субстанцій в різних відділах плаценти на базальних мембранах відтворює інтенсивність адгезії імуноглобулінів та імуноглобулінових комплексів і корелює із кількістю В−лімфоцитів.

Збільшення кількості неоднорідних за оптичною щільністю SBA+−агрегатів протягом третього періоду вагітності на межі материнської і плодової частин плаценти відображає неспроможність клітин трофобласту зруйнувати за рахунок літичних ферментів імунні комплекси, які накопичуються в фібриноїдних масах. В свою чергу SBA+−субстанції можуть розпізнаватися як антигени макрофагами, що призводить до розвитку імунної реакції матері проти плоду, як аллотрансплантанту, наприкінці вагітності і до порушення цілісності тканинного бар’єру.

Специфічними маркерами до вуглеводного компоненту фібронектину, який є одним із компонентів фібриноїду, вважається лектин арахісу (PNA). PNA+−вуглеводні залишки, які входять до складу молекули фібронектину, відтворюють експресію рецептору адгезії. Фібронектин є адгезином для активованих Т− та В− лімфоцитів, NK−лімфоцитів, для Т−лімфоцитів пам’яті та макрофагів. Посилене відкладання материнського і плодового PNA+−фібриноїду можливо розцінювати як результат напруження імунологічних взаємовідношень між матір’ю і плодом.

Ламінін – глікопротеїн базальних мембран, вуглеводна частина якого адгезує NK−клітини і активовані лімфоцити і специфічно зв’язується з лектином ікри окуня (PFA). У тварин експериментальних груп, після дії антигенів на материнський і плідний організм, збільшується інтенсивність відкладання часточок бензидину на мембранах клітин трофобласту і базальних мембранах плодових судин та судин децидуальної оболонки. Ламінін, як адгезивна молекула відіграє важливу роль для адсорбції лімфоцитів.

PFA+−ламінін належить до глікопротеїнів базальних мембран, вуглеводна частина якого адгезує NK−клітини і активовані лімфоцити. Чутливість NK−клітин прямо пропорційна рівню експресії рецепторів ламініна на клітинах−мішенях.

Поява в фібриноїдних нашаруваннях рецепторів до вуглеводних речовин з кінцевими залишками манози вказує на порушення трофічної функції плаценти, що пов’язано з відкладанням на поверхні лакун нерозчинних протеїнів.

Таким чином, проведені дослідження доводять, що морфо−функціональний стан імунологічного бар’єру в системі мати−плацента−плід забезпечується давньою і консервативною системою лектинового розпізнавання „свого” – „не свого”. Пошкодження тканин трофобласту материнськими цитотоксичними лімфоцитами має постійний, каскадний характер, починаючи з глікокаліксу клітин, їх цитоплазматичних мембран та базальних мембран. Ієрархія лектинопосередкованих механізмів захисту трофобласту має також ступінчатий характер.

Лімфоцит, як фактор морфогенезу ладен впливати на функціональний стан фібробластів, що пов’язано із синтезом колагенів декількох типів.

До колагену IV типу виявляє адгезивні властивості фібронектин, клітинний і плазмовий за походженням. Утворені конгломерати входять до складу фібриноїду і є складовою гемато−плацентарного бар’єру.

Отримані результати представлено у таблиці до статті.

**Висновок.** Досліджено взаємозв’язок вуглеводного компоненту структур фібриноїду з адгезивними властивостями імунокомпетентних клітин.

**Список використаної літератури.**

1. Кущ О. Г. Особливості синтезу колагенів в плаценті при фізіологічно перебігаючий вагітності та при пізніх гестозах / О. Г. Кущ // Здобутки клінічної і експериментальної медицини. – 2006. – № 2 (6). – С. 148–151.

# Annals of the New York Academy of Sciences / B. A. Murray, G. Owens, K. L. Crossin [еt аl.] // J. Cell Biol. – 1986. - № 103. – Р. 1431-1439.

1. An IgG Monoclonal Antibody against Dictyostelium discoideum Glycoproteins Specifically Recognizes Fuc–α1, 6GlcNAcβ in the Core of N–Linked Glycans. Localized expression of core–fucosylated glycoconjugates in human tissues / G. Srikrishna, N. M. Varki, P. C. Newell [et al.] // The American Society for Biochemistry and Molecular Biology. – 1997. – Vol. 272, № 41. – P. 25743–25752.
2. Bisecting GlcNAc mediates the binding of annexin V to Hsp47 / Cong–xiao Gao, Eiji Miyoshi, Naofumi Uozumi [et al.] // Glycobiology. – 2005. – № 15 (11). – Р. 1067–1075.
3. Crystal structure of a recombinant αEC domain from human fibrinogen–420 / G. Spraggon, S. J. Applegate, S. J. Everse [et al.] // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1998. – Vol. 95. – P. 9099–9104.
4. Erickson H. P. Еvolution of the tanoscin family–implication for function of the C–terminal fibrinogen–like domoin / H. P. Erickson // Perspect. Dev. Neurobiol. – 1994. – № 1. – Р. 9–19.

# EvansE*.* Adhesion of surfactant-membrane covered droplets: Special features and curvature elasticity effects / Е.Evans //Coll. Surf. - 1990. - №43. – Р.327*–*347.

# LawrenceM.B. Leukocytes roll on a selectin / M.B*.* Lawrence, T.A.Springer //Cell. – 1991. - №.65. – Р. 859-873*.*

1. Phenotype–associated lectin–binding profiles of normal and transformed blood cells: a comparative analysis of mannose– and galactose–binding lectins from plants and human serum/placenta / K. K. Mann, S. Andre, H. J. Gabius [et al.] // Eur. J. Cell Biol. – 1994. – № 65 (1). – P. 145–151.
2. Reisner Y. Separation of antibody helper and antibody suppressor human T cells by using soybean agglutinin / Y. Reisner, J. W. Chiao, N. Sharon // J. Natl. Acad. Sci USA. – 1980. – Vol. 77, № 11. – P. 6778–6782.

# [Ruoslahti E](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Ruoslahti%20E%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=2821619). New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins / Е. Ruoslahti, M.D. [Pierschbacher](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Pierschbacher%20MD%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=2821619) // Science. – 1987.- № 238 (4826). - Р. 491-497.

1. Specific lectin binding to beta1 integrin and fibronectin on the apical membrane of madin–darby canine kidney cells / J. [Praetorius,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed&cmd=Search&term=%22Praetorius+J%22%5BAuthor%5D) P. [Backlund,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed&cmd=Search&term=%22Backlund+P%22%5BAuthor%5D) A. L. [Yergey](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed&cmd=Search&term=%22Yergey+AL%22%5BAuthor%5D) [et al.] // J. Membr. Biol. – 2001. – Vol. 184. – Р. 273–281.

# Springer T.A. Adhesion receptors of the immune system / T.A. Springer // Nature .- 1990. - № 346 (6283). - Р. 425-434.

1. Unaltered Distribution of Laminins, Fibronectin, and Tenascin in Celiac Intestinal Mucosa / М. Korhonen, М. Ormio, E. Robert [et al.] // J. of Histochemistry and Cytochemistry. – 2000. – № 48. – Р. 1011–1020.