

УДК: 611.611:581.162.1]-018.1

DOI: <https://doi.org/10.25040/aml2018.02.039>

## ЛЕКТИНИ ЗАРОДКІВ ПШЕНИЦІ ТА НАСІННЯ ЗОЛОТОГО ДОЩУ ЯК СЕЛЕКТИВНІ ГІСТОХІМІЧНІ МАРКЕРИ СТРУКТУРНИХ КОМПОНЕНТІВ НИРКИ ЩУРА

*Амбарова Н.О., Луцик С.О.*

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького  
Кафедра гістології, цитології і ембріології (зав. - проф. Луцик О.Д.)

### Реферат

Селективне виявлення окремих типів і субпопуляцій клітин, екстрацелюлярних структур органів і тканин продовжує залишатися актуальним напрямком сучасної морфологічної науки.

**Мета** дослідження полягала у вивченні можливостей використання лектину зародків пшениці (WGA, специфічний до DGlcNAc, NeuNAc) та лектину насіння Золотого дощу (*Laburnum anagyroides*, LASA, специфічний до LFuc, DGal) для селективного гістохімічного маркування структурних компонентів нирки дорослих та новонароджених щурів.

**Результати й обговорення.** У нирках дорослих щурів лектин WGA селективно взаємодіяв з подоцитами, мезангіоцитами та фільтраційною мембраною ниркових тілець, щіточковою облямілкою проксимальних трубочок, цитоплазматичними глікокон'югатами в апікальній частині клітин дистальних трубочок нефронів, а також з плазматичною мембраною люменальної поверхні збірних ниркових проток. У нирках новонароджених щурів рецептори лектину WGA експонувалися виключно на люменальній поверхні субкапсулярних S-подібних тілець і ростучої мережі ниркових трубочок. Щодо лектину LASA структурні компоненти паренхіми нирок дорослих щурів демонстрували помірно виражену гомогенну реактивність, з децю підвищеною афінністю означеного лектину до ядер подоцитів та клітин мезангіуму, що істотно відрізнялося від характеру маркування лектином WGA. У нирках новонароджених щурів виявлено інтенсивне селективне зв'язування лектину LASA з цитоплазматичними глікокон'югатами клітин ниркових трубочок середньої ділянки ниркової паренхіми у поєднанні з цілковитою ареактивністю її субкапсулярної та мозкової речовини. Згідно з отриманими даними, лектин WGA можна рекомендувати в якості селективного гістохімічного маркера фільтраційної мембрани, подоцитів та мезангіоцитів ниркових тілець, щіточкової облямілки проксимальних трубочок і люменальної плазматичної мембрани збірних ниркових проток дорослих щурів. Лектин LASA виявився селективним маркером ростучих ниркових трубочок неонатальних щурів, що може мати значення в ембріологічних дослідженнях.

**Висновки.** У зв'язку з високим вмістом та значним різноманіттям глікокон'югатів, нирку щура можна рекомендувати в якості адекватної тест-моделі для відпрацювання протоколів лектиногістохімічних досліджень, зокрема, при вивченні гістохімічної специфічності нових препаратів лектинів. Морфогенез органів супроводжується значним ремоделюванням вуглеводних детермінант, що слід враховувати при селективному маркуванні

гістоструктур. Додаткове зафарбовування ядер клітин гематоксиліном після візуалізації лектинових рецепторів можна розглядати як альтернативний метод, що дозволяє більш точно ідентифікувати гістотографію глікополімерів, а також може бути корисним при проведенні морфометричних досліджень. При цьому, однак слід мати на увазі, що барвники можуть взаємно накладатися, що створюватиме певні труднощі в інтерпретації результатів.

**Ключові слова:** нирка щура, селективне маркування, постнатальний морфогенез, лектинова гістохімія

### Abstract

#### LECTINS WGA AND LASA AS SELECTIVE HISTOCHEMICAL MARKERS OF RAT KIDNEY

AMBAROVA N.A., LUTSYK S.A.

The Danylo Halytsky National Medical University in Lviv

Selective detection of individual types and subpopulations of cells, extracellular structures of organs and tissues continues to be a relevant area of modern morphological science.

**Aim.** To investigate the applicability of wheat germ agglutinin (WGA, specific to DGlcNAc, NeuNAc) and *Laburnum anagyroides* seeds agglutinin (LASA, specific to LFuc, DGal) for selective histochemical labeling of renal constituents of adult and newborn rats.

**Results and Discussion.** In the kidneys of adult rats WGA label was restricted to filtration membrane, podocytes and mesangial cells of renal corpuscles, brush border of proximal tubules, cytoplasmic glycoconjugates in the apical part of the distal tubule cells, as well as to plasma membranes of the luminal surface of collecting ducts. In the kidneys of newborn rats WGA receptor sites were selectively exposed on the luminal surfaces of subcapsular S-shaped bodies and of developing nephrons tubular network. With respect to LASA, structural components of renal parenchyma of the adult rats demonstrated moderate homogeneous reactivity accompanied with enhanced LASA affinity to podocytes and mesangial cells nuclei, this mode of labeling being significantly different from WGA receptor sites histotopography. In the neonatal rat kidneys there was detected an intense selective binding of LASA to cytoplasmic glycoconjugates of the developing midrenal tubular network, subcapsular and medullary parts of renal parenchyma being completely non-reactive. According to the obtained data, WGA can be recommended for selective histochemical labeling of renal corpuscles filtration membrane, podocytes and mesangial cells, as well as for brush border of proximal tubules and luminal plasma membrane of collecting ducts of adult rat kidneys. LASA

*lectin selectively marked developing midrenal tubules of neonatal rats, this option may be of certain significance in embryological studies.*

**Conclusions.** *Due to the high content and vast diversity of glycoconjugates, rat kidneys can be recommended as an adequate model for testing lectin histochemistry protocols, in particular; while studying histochemical specificity of new lectin preparations. The organ morphogenesis is accompanied by significant remodeling of carbohydrate determinants, which can influence selectivity of organ structures labeling. Additional staining of the cell nuclei by hematoxylin after lectin receptor sites visualization can be considered an alternative method that allows more precise identification of carbohydrate histotopography, as well as for morphometric studies. However, it should be kept in mind that both dyes can be overlapping, creating certain difficulties in the interpretations of results.*

**Key words:** *rat kidney, selective labeling, postnatal morphogenesis, lectin histochemistry*

## Вступ

Селективне виявлення окремих типів і субпопуляцій клітин, екстрацелюлярних структур органів і тканин продовжує залишатися актуальним напрямом сучасної морфологічної науки. Нові можливості у цій сфері відкрилися у зв'язку з використанням методів лектинової гістохімії [1, 2]. Володіючи унікальною властивістю вибірково зв'язуватися з термінальними моно- чи дисахаридними залишками олігосахаридних ланцюгів глікополімерів, лектини дозволяють отримати достовірну інформацію щодо їхньої гістотопографії, перебудови при реалізації процесів ембріо- та морфогенезу, у динаміці фізіологічних відправлень та розвитку різноманітних форм патології [3-9]. Серед широкого спектру можливостей практичного застосування лектинів вагомим місцем належить селективному маркуванню мікро- та ультраструктур біологічних об'єктів.

Мета дослідження полягала у вивченні можливостей використання лектинів зародків пшениці (WGA) та насіння Золотого дощу (LASA) в якості селективних гістохімічних маркерів структурних компонентів нирки щурів.

## Матеріал і методи

У роботі використано нирки 3 щурів-самців лінії Вістар масою 180-200 г, а також 4 новонароджених щурів. Тварини утримувались у стандартних умовах віварію з дотриманням санітарно-гігієнічних норм та раціону харчування. Дослідження здійснювалися за погодженням Комісією з біоетики ЛНМУ імені Данила Галицького (Про-

токол № 3 від 14.03.2016 р.) у відповідності з положенням Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986 р.), Директиви Ради Європи 2010/63/EU, Закону України № 3447-IV "Про захист тварин від жорстокого поводження".

Нирки забирали після декапітації тварин під дієтилефірним наркозом, розрізали по серединній площині, фіксували у рідині Буена, зневоднювали у спиртах зростаючої концентрації, ущільнювали і заливали у парафін. Для отримання оглядових препаратів зрізи товщиною 5-7  $\mu\text{m}$  зафарбовували гематоксиліном та еозином. Вуглеводні детермінанти структурних компонентів нирки виявляли лектином зародків пшениці (Wheat germ agglutinin, WGA, специфічний до залишків DGlcNAc > NeuNAc) та малодослідженим у морфологічному плані лектином насіння Золотого дощу (Laburnum anagyroides seed agglutinin, LASA, специфічний до залишків LFuc, DGal), які були очищені та кон'юговані з пероксидазою професором В. Антонюком [4].

Візуалізацію місць зв'язування лектинів здійснювали з використанням 3,3'-діамінобензидину тетрагідрохлориду (Sigma, США) у присутності пероксиду водню; у частині препаратів ядра клітин дофарбовували гематоксиліном. Контроль специфічності гістохімічних реакцій проводили як описано раніше [3]. Огляд та фотографування гістологічних препаратів здійснювали за допомогою мікроскопа "Granum", обладнаним камерою "Echo-Imager 502000" з використанням програми "TourView 3.2".

## Результати і обговорення

**Лектин WGA.** У препаратах нирок дорослих щурів виявлено зв'язування лектину з фільтраційною мембраною, подоцитами і мезангіоцитами ниркових тілець, щіточковою облямівкою проксимальних трубочок, глікокон'югатами в апікальній цитоплазмі дистальних трубочок нефронів, а також з плазматичними мембранами люменальної поверхні збірних ниркових проток (рис. 1). У нирках новонароджених щурів експонування рецепторів лектину WGA було асоційоване виключно з капсулою, люменальною поверхнею субкапсулярних S-подібних тілець і ростучих ниркових трубочок (рис. 2).



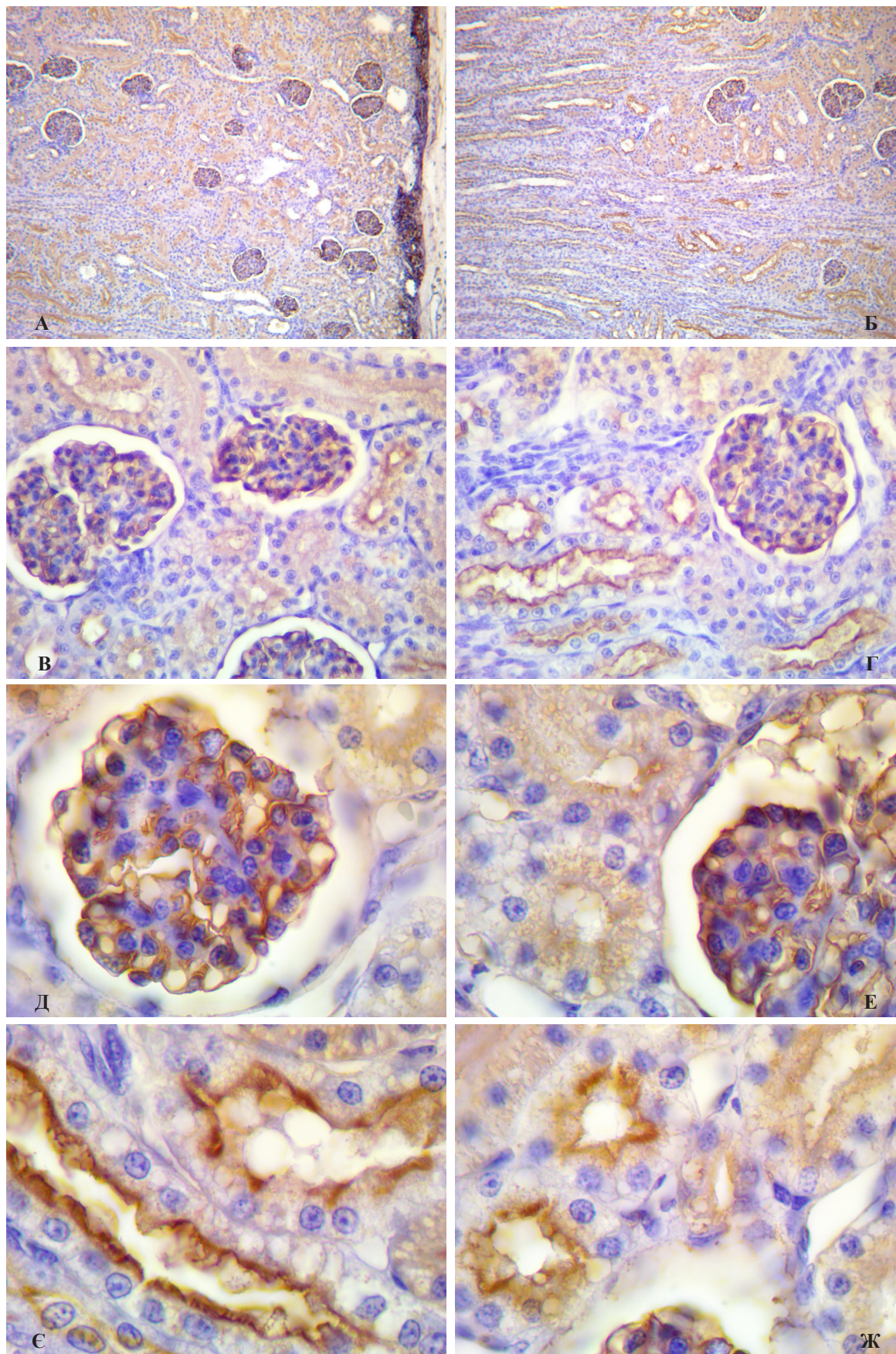


Рис. 1

Нирка дорослого щура після обробки лектином WGA: значна реактивність базальної мембрани, цитоплазматичних глікокон'югатів подоцитів та мезангіоцитів, щіточкової облямівки проксимальних трубочок нефронів, люменальної поверхні збірних ниркових проток; ядра клітин дофарбовані гематоксиліном. А, Б×100; В, Г×400; Д, Е, Є, Ж×1000



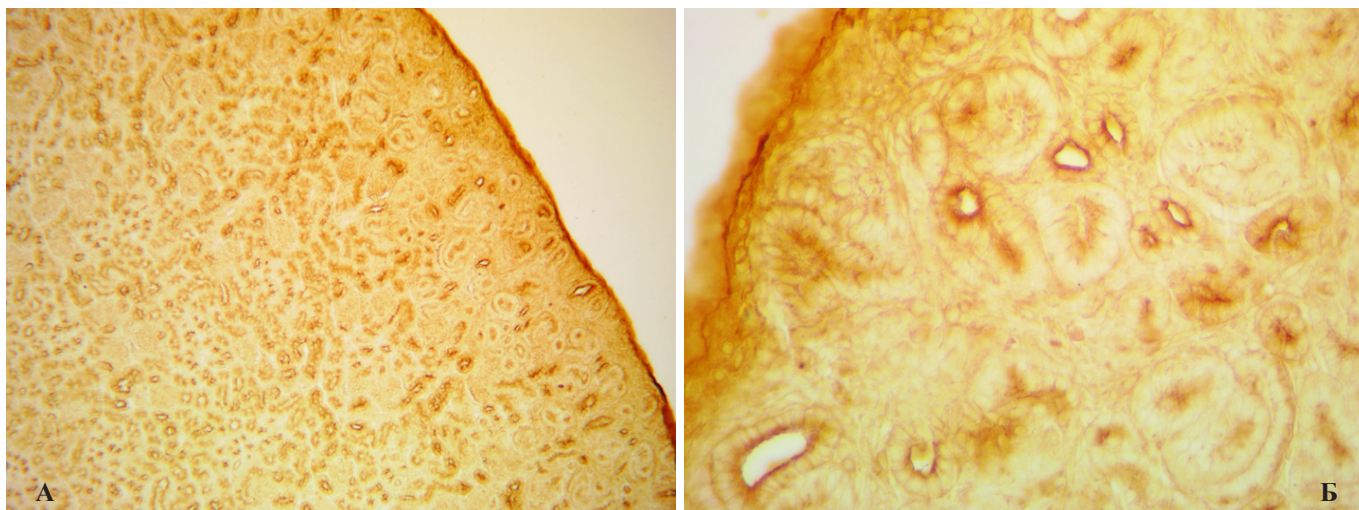


Рис. 2

Нирка новонародженого щура, обробка лектином WGA: підвищена реактивність люменальної поверхні субкапсулярних S-подібних тілець, ростучих ниркових трубочок. А×100, Б×400

**Лектин LASA.** Структурні компоненти паренхіми нирки дорослого щура демонстрували помірну гомогенну реактивність з лектином LASA, що суттєво відрізнялася від гістотопографії рецепторів лектину WGA. У складі ниркових тілець привертала увагу інтенсивна реактивність ядер подоцитів та мезангіоцитів, а також ядер частини проксимальних трубочок нефронів (рис. 3). При дослідженні нирок новонароджених щурів виявлено інтенсивне вибіркоче зв'язування лектину LASA з цитоплазматичними глікокон'югатами клітин ниркових трубочок середньої частини нирки; S-подібні тільця, а також тубулярні структури мозкової речовини залишались ареактивними (рис. 4).

Таким чином, у динаміці морфогенезу

нирки об'єкти селективного маркування змінювалися, що пов'язано з редукцією одних і експонуванням інших вуглеводних детермінант. При порівнянні наведених вище даних з отриманими раніше результатами [10-12] привертала увагу взаємодія практично усіх використаних лектинів арахісу і сої, зі структурними компонентами ниркових тілець, щіточковою облямівкою трубочок нефронів, плазматичною мембраною збірних ниркових проток, що свідчить про активне залучення означених структур до процесів гістофізіології нирок.

Дофарбовування ядер клітин гематоксином після візуалізації лектинових рецепторів можна вважати альтернативним методом, який

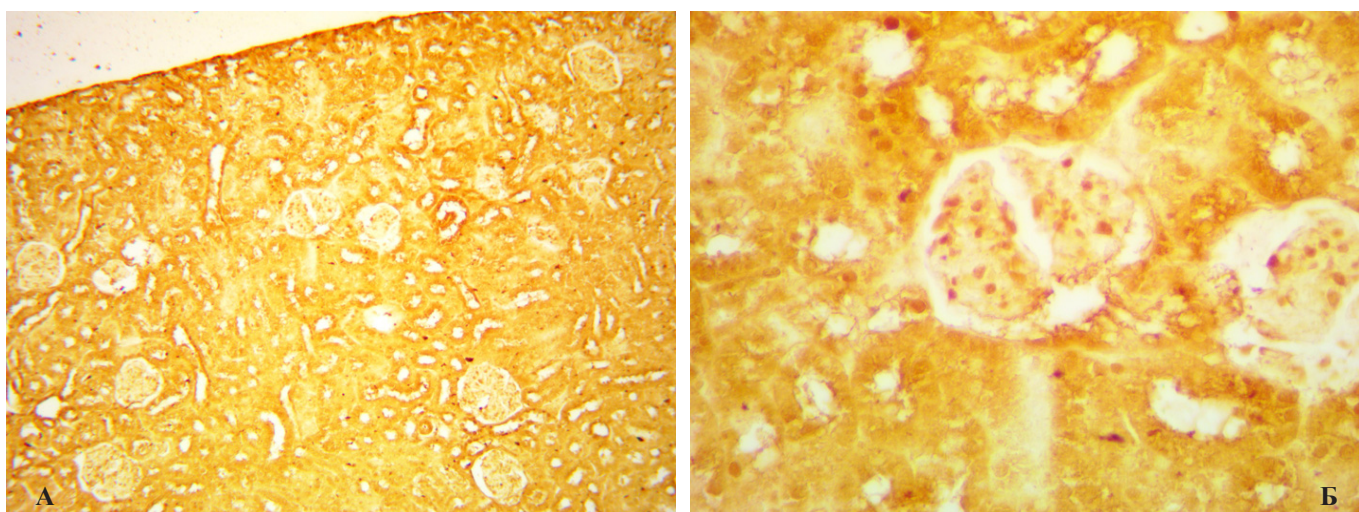


Рис. 3

Нирка дорослого щура після обробки лектином LASA: в ниркових тільцях інтенсивно зафарбовані ядра подоцитів та мезангіоцитів, помірна реактивність цитоплазматичних глікокон'югатів клітин ниркових трубочок. А×100, Б×400



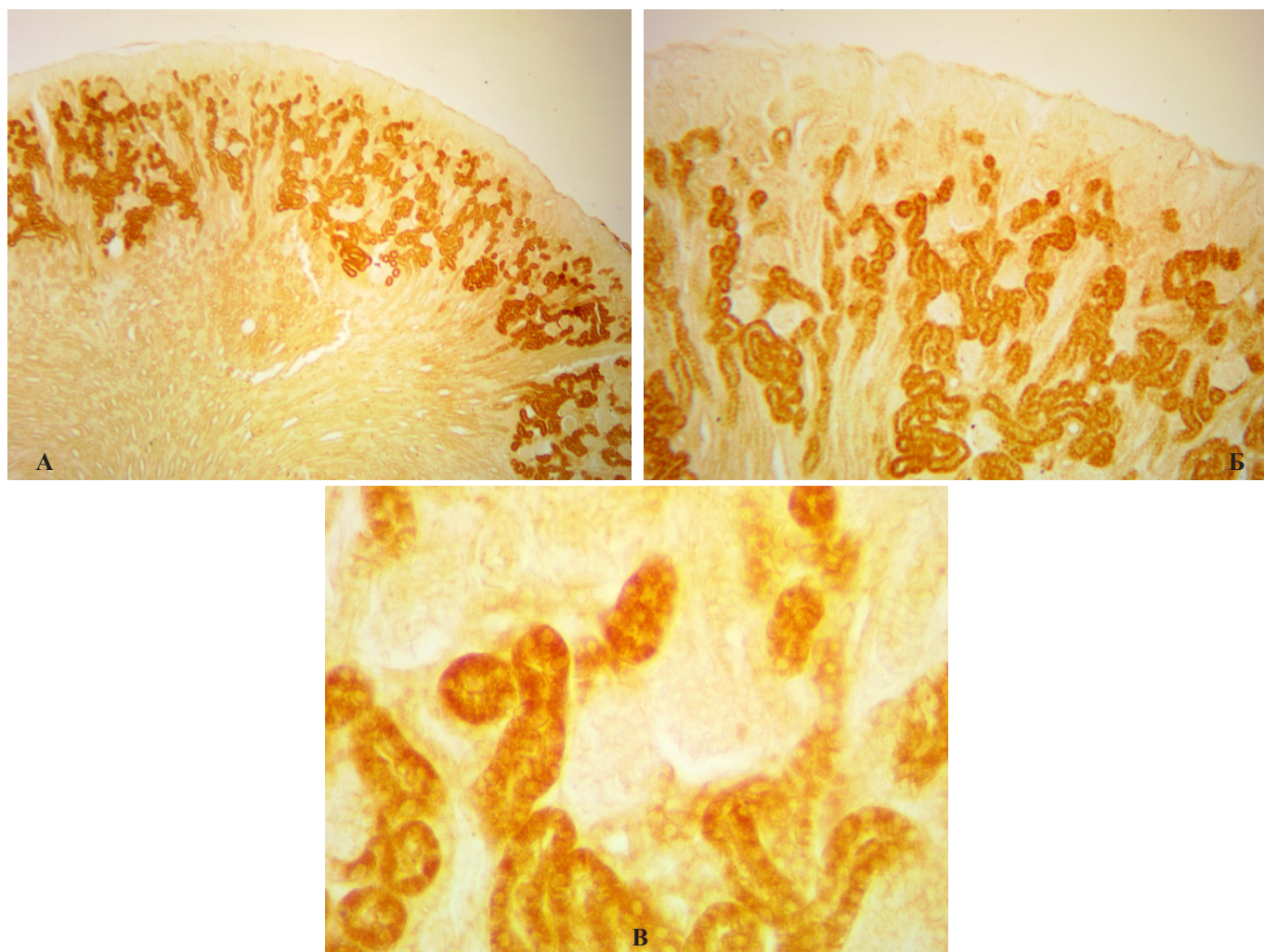


Рис. 4

*Нирка новонародженого щура, обробка лектином LASA: вибіркове зв'язування лектину з цитоплазматичними глікокон'югатами клітин ростучих ниркових трубочок серединної частини нирки. А×40, Б×100, В×400*

дозволяє краще ідентифікувати місця зв'язування лектинів, особливо при виченні об'єктів зі складною гістоархітектонікою, а також при проведенні морфометричних досліджень. При цьому, однак, слід пам'ятати, що може мати місце взаємне накладання обох барвників, як, наприклад, при зв'язуванні лектину з глікополімерами ядерної локалізації (рис.3). У такому випадку серійні зрізи краще зафарбовувати гематоксиліном та еозином і, окремо, лектинами з наступним порівнянням отриманих гістопрепаратів.

### Висновки

Отримані дані дозволяють рекомендувати лектин WGA в якості селективного гістохімічного маркера фільтраційної базальної мембрани, подоцитів та мезангіоцитів ниркових тілець, щіткової облямівки проксимальних трубочок нефронів та плазматичної мембрани люменальної

поверхні збірних ниркових проток дорослих щурів. Лектин LASA вибірково маркував дистальні трубочки нефронів новонароджених щурів, що може бути корисним у ембріологічних дослідженнях. Нирки щура завдяки високому вмісту і різноманіттю глікополімерів слід вважати адекватним тест-об'єктом для відпрацювання методів лектинової гістохімії, зокрема, при порівнянні гістохімічної специфічності нових препаратів лектинів із загальноновизнаними добре охарактеризованими зразками.

### Література

1. Lutsyk AD. Lectins as selective histochemical markers of distinct cell types, their subpopulations and of extracellular tissue components. Arch Anat Histol Embryol. 1988; 95(11): 83-104 (Russian).
2. Smolkova O, Zavadka A, Bankston P, Lutsyk A. Cellular heterogeneity of rat vascular endothelium as detected by HPA and GS-I lectin-gold probes. Med Sci Monit. 2001;

- 7(4): 659-668.
3. Lutsyk AD, Detiuk ES, Lutsyk MD. Lectins in histochemistry. Lviv, Vyshcha shkola, 1989. -144 p. (Russian).
  4. Antonyuk VO. Lectins and their resources. Lviv, Kvant, 2005.-554 p. (Ukrainian)
  5. Brooks SA, Dwek MV, Schumacher U. Functional and molecular glycobiology. Oxford, Bios Scientific Publishers, 2002.-268 p.
  6. Gabius HJ. The sugar code: why glycans are so important. Biosystems. 2018; 164: 102-111.
  7. Roth J. Lectins for histochemical demonstration of glycans. Histochem Cell Biol. 2011. 136(2): 117-130.
  8. Sharon N, Lis H. Lectins. 2nd ed. Dordrecht, Springer, 2007.-464 p.
  9. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME. Essentials of glycobiology. 2nd ed. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009: 29-178.
  10. Lutsyk A, Ambarova N, Antonyuk V. Diabetic alteration versus postnatal maturation of rat kidney glycoconjugates: comparative detection by lectin probes. Folia Histochem Cytobiol. 2013; 51(1): 92-102.
  11. Ambarova NA. Lectin from *Clitocybe nebularis* fungus: a new histochemical reagent for the investigation of renal morphogenesis and histopathology. World of Medicine and Biology. 2016; 1(55): 119-121 (Ukrainian).
  12. Ambarova NA, Lutsyk AD. Selective histochemical labeling of normal rat kidney and that affected by streptozotocin-induced diabetes mellitus using lectin from *Lactarius pergamenus* fungus. Morphologia. 2017; 11(4): 23-27 (Ukrainian).