

**С.В.Харченко  
Е.Ю.Шаповалова**

Крымский государственный медицинский университет им. С.И.Георгиевского

**Ключевые слова:** эмбриогенез крысы, легкие, почки, парацетамол, нимесулид, лектины.

Надійшла: 05.09.2009  
Прийнята: 23.09.2009

УДК: 615.03:591.339+591.392.1:615.9:611.611+611.2

## **ЛЕКТИНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭМБРИОГЕНЕЗА ЛЕГКИХ И ПОЧЕК КРЫС, ПРОТЕКАЮЩЕГО В УСЛОВИЯХ ОТСУТСТВИЯ ВИДИМЫХ ПОВРЕЖДАЮЩИХ ФАКТОРОВ И ПОД ВЛИЯНИЕМ ПАРАЦЕТАМОЛА И НИМЕСУЛИДА**

*Исследование проведено в рамках научно-исследовательской работы «Закономерности пренатального и постнатального гисто- и органогенеза при типической и атипической имплантации» (номер государственной регистрации 0104U009463).*

**Резюме.** Изучены 467 зародышей крыс в возрасте с 13-х по 22-е сутки пренатального развития, протекавшего в отсутствие видимых повреждающих факторов и под влиянием терапевтической, субтоксической, токсической дозы парацетамола и нимесулида. Срезы обрабатывали набором из трех лектинов, конъюгированных пероксидазой хрена. Установлено, что в клетках и неклеточном матриксе развивающихся легких и окончательных почек плодов крыс контрольной группы содержатся гликополимеры лектинов клещевины, арахиса и сои. В процессе эмбриогенеза легких и окончательных почек крыс контрольной группы происходит постоянная перестройка лектин-рецепторных систем. Введение парацетамола и нимесулида беременными крысами приводит к измененной по сравнению с нормой перестройке количества и гистотопографии гликополимеров – рецепторов лектинов сои, арахиса и клещевины. Наиболее сильно на гистотопографию и количество рецепторов лектинов сои, арахиса и клещевины в легких влияет терапевтическая и токсическая доза парацетамола и токсическая доза нимесулида. В окончательных почках аналогичное влияние имеет терапевтическая доза парацетамола и токсическая доза нимесулида.

**Морфологія.** – 2009. – Т. III, № 3. – С. 131-135.  
© С.В.Харченко, Е.Ю.Шаповалова, 2009

**Kcharchenko S.V., Shapovalova Ye.Yu. Lectinohistochemical investigation of rat lung and kidney embryogenesis in conditions of damaging factors absence and under paracetamol and nimesulide influence.**

**Summary.** 467 rat embryos in the age from 13 to 22 day of the intrauterine life without visible damaging factors and under the influence of a therapeutic, subtoxic, toxic dose of paracetamol and nimesulide were investigated. Glycopolymers have been identified by three lectins, conjugated with peroxidase of horse-radish. It is established, that in cells and extracellular matrix of developing rat lungs and definitive kidney of control group contain peanut, soya and ricina glycopolymers. In process of control group rat lungs and definitive kidney embryogenesis there is constant lectin-receptor system redistribution. Paracetamol and nimesulide ingestion to pregnant rats leads to the redistribution of glycopolymers quantity and histotopography – receptors of soya, peanut and ricina lectins, changed in comparison with norm. Therapeutic and toxic dose of paracetamol and a toxic dose of nimesulide most strongly change histotopography and the quantity of lectins soya, peanut and ricina receptors in lungs. In definitive kidneys the therapeutic dose of paracetamol and a toxic dose of nimesulide has similar influence.

**Key words:** rat's embryogenesis, lung, kidney, paracetamol, nimesulide, lectins.

### **Введение**

Широко известным является тот факт, что до 95% женщин на определенном сроке беременности принимает в среднем четыре препарата (Бегг Э., 2004). По данным (Зарицкой И.С., 2007) 40% женщин принимают медикаменты в течение критического I триместра беременности, а 25% беременных употребляют лекарственные средства длительное время (Абрамченко В.В., 1994).

Нестероидные противовоспалительные препараты занимают одно из первых мест по частоте их использования беременными. Парацетамол является лидером среди лекарственных средств данной группы. Нимесулид более новый препарат, но не намного менее активно применяется беременными. Данных о неблагоприятном воздействии названных фармакологических средств на почки, легкие плода существует достаточно мно-

го. Однако работ, изучающих морфогенез органов под влиянием парацетамола и нимесулида, насчитываются единицы (Peruzzi L. et al., 1999; Benini D. et al., 2004; Neto J.A. et al., 2004; Ali U.S. et al., 2006) и вопрос о возможности назначения этих препаратов беременным уже длительное время остается спорным. Кроме того, в имеющихся малочисленных исследованиях не был использован метод лектиновой гистохимии, который в современной науке рассматривается как один из наиболее информативных методов, позволяющих идентифицировать гликоконъюгаты, играющие важнейшую роль в процессах морфогенеза.

**Целью и задачей нашего исследования** явилось изучение распределения рецепторов к лектинам клещевины, сои, арахиса на поверхности и в цитоплазме клеток паренхимы, стромы и в тканевых экстрацеллюлярных структурах легких и почек эмбрионов и плодов крыс, развивавшихся в нормальных условиях и под воздействием терапевтической, субтоксической, токсической дозы парацетамола и нимесулида.

#### **Материалы и методы**

Изучены 467 зародышей крыс в возрасте с 13-ых по 22-е сутки пренатального развития, протекавшего в отсутствие видимых повреждающих факторов и под влиянием терапевтической, субтоксической, токсической дозы парацетамола и нимесулида. Обзорные препараты окрашивали гематоксилином и эозином. Рецепторы лектинов выявляли путем обработки серийных срезов лектинами клещевины, сои и арахиса, конъюгированных с пероксидазой хрена. Препараты обрабатывали с применением стандартных наборов НПК «Лектиногест» (Львов) в разведении лектина 1:50 по рекомендуемой методике (Луцик А.Д. и соавт., 1989). Визуализацию мест связывания лектинов проводили по системе диаминобензидин-перекись водорода. Контроль специфичности реакции осуществляли путем исключения из схемы обработки препаратов диаминобензидина. Лектин клещевины (RCA) специфичен к концевым нередуцирующим остаткам бета-D-галактозы, экранированной сиаловой кислотой, лектин сои (SBA) – к N-ацетил-D-галактозамину, лектин арахиса (PNA) – к в-D-галактозе. Сокращенные наименования лектинов представлены в соответствии с международной классификацией лектинов (Lectin biology, biochemistry, clinical biochemistry, 1983). Специфичность лектинов к терминальным нередуцирующим моносахаридным остаткам гликоконъюгатов приведена в соответствии с данными (Антонюк В.О., 2005; Волошин Н.А. и соавт., 2005). Интенсивность окрашивания срезов различными лектинами оценивалась в баллах. Баллы 0,1,2,3,4 – отсутствие реакции, слабая, умеренная, сильная и очень сильная.

#### **Результаты и их обсуждение**

В норме гликополимеры с концевыми нередуцирующими остатками бета-D-галактозы, экранированной сиаловой кислотой, присутствуют во всех компонентах эпителиальных и мезенхимных закладок метанефроса у 15 суточного зародыша. Изменение гистотопографии рецепторов лектина клещевины в клетках сосудистого клубочка и на базальной поверхности клеток наружного листка капсулы происходит только на 21 сутки развития. В других элементах метанефроса изменение активности реакции наблюдается еще позже, в течение 22 суток. Введение терапевтической дозы парацетамола беременным самкам приводит к существенным изменениям количественного содержания мест связывания лектина у 17 суточного зародыша. Во всех изученных структурах выявлено более активное, чем в норме накопление сиалоконъюгатов на ранних этапах развития, но более пассивный их синтез в конце изученного периода. Субтоксическая доза парацетамола проявляет свое негативное действие раньше, на 16 сутки эмбриогенеза. В дальнейшем изменения количества бензидиновой метки, вызванные субтоксической дозой и отличающиеся от нормального их числа, идентичны таковым при воздействии терапевтической дозы парацетамола. Токсическая доза этого препарата влияет на закономерную динамику экспрессии рецепторов к лектину клещевины, но не так значительно. Результаты исследования показали, что терапевтическая доза нимесулида более негативна, чем все три дозы парацетамола. Субтоксическая и токсическая дозы нимесулида также меняют типичный для нормы ход реакции и приводят к особому перераспределению рецепторов к лектину клещевины.

В легких на 13 сутки эмбриогенеза RCA-положительный материал постоянно выявляется во всех структурах, кроме базальной поверхности, которая начинает проявлять сродство к бензидиновой метке к 15 суткам и цитолеммы эпителиоцитов бронхов, начинающей окрашиваться в 17 суточном возрасте зародыша. Эти компоненты эпителия сохраняют неизменным содержание гликоконъюгатов до конца развития. Для других элементов характерно волнообразное течение реакции. Каждая из трех доз парацетамола нарушает типичное для нормы перераспределение RCA-биополимеров. Выделить какая из изучаемых доз данного лекарственного средства более всех меняет содержание рецепторов достаточно трудно. Но можно определить, что воздействие терапевтической, субтоксической и токсической доз нимесулида менее агрессивно.

Гликополимеры с концевыми нередуцирующими остатками бета-D-галактозы, взаимодействующими с лектином арахиса, обнаруживаются на ранних этапах развития метанефроса у 15 суточных зародышей, развивающихся в нор-

мальных условиях. Их количество поддерживается на постоянном уровне в течение длительного отрезка времени, изменяясь в сторону снижения их содержания лишь к 22 суткам пренатального развития практически во всех компонентах эпителиальных закладок метанефроса (рис.1).

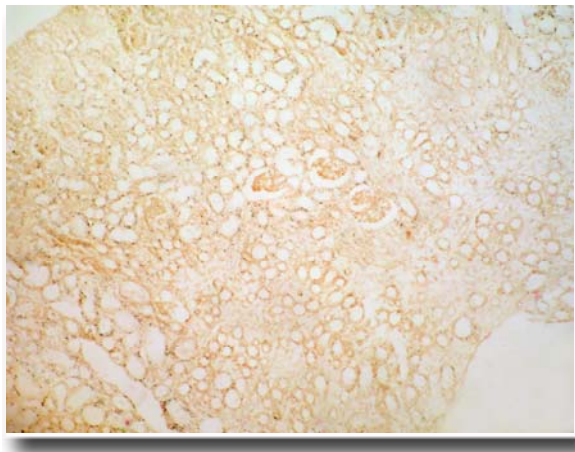


Рис. 1. Зародыш в возрасте 22 суток. Срез метанефроса с нефронами четырех поколений. Обработка конъюгатом лектина клебеллы с пероксидазой хрена. Проявление в системе диаминобензидин –  $H^2O^2$ .  $\times 400$ .

Цитоплазма клеток наружного листка капсулы, которая ареактивна в течение всего периода развития, а также базальной поверхности названных клеток, сохраняют слабое окрашивание. Угнетение реакции в структурах мезенхимных клеток начинается на 17 сутки, то есть раньше, чем в эпителии. Проявления воздействия всех трех доз парацетамола на перераспределение рецепторов лектина арахиса обнаруживаются уже к 16 суткам развития, однако наиболее они выражены после воздействия субтоксической дозы этого препарата. У 17 суточного зародыша все три дозы парацетамола приводят к изменениям во всех элементах дифференцирующихся нефронов. Это особенно заметно в отношении терапевтической дозы препарата, так как в цитоплазме клеток сосудистого клубочка, на апикальной поверхности клеток наружного листка капсулы и эпителии канальцев, ярко окрашенных в отличие от нормы (рис.2), отсутствует какая-либо динамика. В цитоплазме и на базальной поверхности клеток наружного листка капсулы наоборот происходит перераспределение рецепторов к лектину в сторону их исчезновения, что полностью противоположно норме. Цитолемма клеток мезенхимы становится ареактивной структурой в результате влияния парацетамола. На перераспределение рецепторов в цитоплазме этих клеток более заметно действуют терапевтическая и токсическая дозы парацетамола.

Однако дифференцировка мезенхимных клеток нарушается более значительно после введения нимесулида, особенно его токсической дозы.

При этом характер перераспределения рецепторов существенно отличается от нормального. Терапевтическая и субтоксическая дозы данного препарата также изменяют закономерный ход реакции, но не так заметно. Причем терапевтическая доза менее других доз нимесулида проявляет свои негативные свойства. В отношении эпителиальных закладок было установлено, что клетки сосудистого клубочка более подвержены влиянию терапевтической и субтоксической дозы нимесулида. Однако элементы эпителиоцитов наружного листка капсулы более чувствительны к воздействию субтоксической и особенно токсической дозы. Та же тенденция наблюдается в эпителии канальцев.

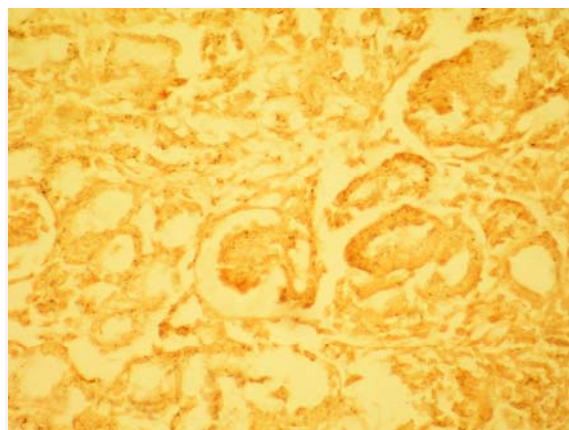


Рис. 2. Нефроны окончательной почки 22-суточного зародыша. Обработка конъюгатом лектина арахиса с пероксидазой хрена. Проявление в системе диаминобензидин –  $H^2O^2$ .  $\times 100$ .

В легких зародышей, развивавшихся в нормальных условиях, рецепторы к лектину арахиса постоянно присутствуют в цитоплазме клеток эпителия бронхов и на цитолемме клеток мезенхимы. Апикальная поверхность эпителиоцитов лектин-негативна в легких самого раннего изученного нами 13 суточного зародыша. Появление высокой концентрации бензидиновой метки происходит в 15 суточном возрасте, а с 17 суток начинается небольшое ее снижение. Базальная поверхность и цитолемма, ранее ареактивные, начинают окрашиваться к 17 суткам. В дальнейшем базальная поверхность сохраняет достигнутую концентрацию, а цитолемма уже к 18 суткам полностью теряет способность к синтезу галактоконъюгатов. Структуры мезенхимных клеток снижают активность синтеза РНА-соединений вплоть до полной его потери цитоплазмой клеток.

Терапевтическая, субтоксическая и токсическая дозы парацетамола вызывают изменения количественного содержания рецепторов лектина арахиса уже к 14 суткам. Все три дозировки меняют концентрацию и характер перераспреде-

ления РНА-положительных гликополимеров, касающееся всех компонентов эпителиальных и мезенхимных закладок легких. Наиболее выражены изменения после действия терапевтической и токсической доз парацетамола. Введение нимесулида более заметно влияет на гистотопографию рецепторов изучаемого лектина. Меняется их количество и гистотопография. Причем достаточно трудно определить какая из доз препарата агрессивнее.

Макромолекулы, содержащие концевые нередуцирующие остатки N-ацетил-D-галактозамина, соединяющиеся с лектином сои, синтезируются на ранних стадиях развития окончательной почки (15 сутки). В большинстве элементов метанефронов изменения гистотопографии рецепторов лектина не происходит, за исключением базальной поверхности наружного листка капсулы, где низкая концентрация бензидиновой метки с 17 по 20 сутки сменяется умеренным ее содержанием в течение 21-22 суток, а также базальной поверхности эпителия канальцев, где происходит волнообразное изменение экспрессии рецепторов к лектину.

Изучая влияние парацетамола на характер экспрессии рецепторов данного лектина, было обнаружено его изменение под воздействием всех трех доз препарата. Выявлено, что субтоксическая и токсическая дозы начинают угнетать синтез SBA-позитивных гликополимеров на цитолемме клеток сосудистого клубочка раньше, чем это происходит в норме или после введения терапевтической дозы, но к концу периода пренатального развития число молекул соответствует норме. Терапевтическая же доза ведет к более низкому содержанию мест связывания лектина на данной структуре. Цитоплазма клеток сосудистого клубочка, клетки наружного листка капсулы также больше подвержены влиянию терапевтической дозы парацетамола. Токсическая доза вызывает наименьшие изменения названных структур. Канальцы в равной мере изменяются после воздействия трех разных доз парацетамола. Нимесулид, введенный беременным самкам, оказывает влияние на связывание лектина сои структурами метанефроса. Причем терапевтическая и токсическая дозы практически одинаково меняют закономерный характер течения реакции. Замечено, что эти две дозы препарата приводят к снижению концентрирующей способности во всех компонентах эпителиальной закладки окончательной почки, тогда как субтоксическая доза действует противоположным образом и ведет к возрастанию цветного проявления реакции, в результате чего структуры приобретают большое и умеренное количество рецепторов лектина в отличие от двух других дозировок нимесулида, когда одна часть структур ареактивна, другая – слабopоложительна.

Элементы эпителиальных закладок легких

зародышей, которые развивались в нормальных условиях, проявляли постепенно возрастающее сродство к лектину сои. Исключение составляет апикальная поверхность эпителия бронхов, обладающая циклическим характером лектин-рецепторной реакции. Клетки мезенхимы также тропны к этому лектину. Цитолемма всегда умеренно положительна, а цитоплазма, имевшая с 13 по 15 сутки мало бензидиновой метки, с 16-х суток начинает накапливать среднее ее количество. Изменение характера синтеза галактозаминоконъюгатов в легких под влиянием парацетамола становится заметным у 14 суточного зародыша. Это более заметно в отношении терапевтической и токсической дозы препарата. Субтоксическая доза парацетамола хоть и вызывает нарушение закономерных лектин-рецепторных взаимодействий, но все-таки приближается к нормальному уровню экспрессии рецепторов к лектину. Все три дозы нимесулида не так агрессивно действуют на изменение нормальной гистотопографии гликополимеров. Закономерная ее динамика нарушается после введения субтоксической и токсической доз нимесулида, терапевтическая оказывает минимальное влияние.

#### **Выводы**

1. В клетках и не клеточном матриксе развивающихся легких и окончательных почек плодов крыс контрольной группы содержатся галактозаминоконъюгаты (рецепторы лектина сои), галактоконъюгаты (рецепторы лектина арахиса) и гликополимеры с углеводной детерминантой бета-D-галактозы, экранированной сиаловой кислотой (рецепторы лектина клещевины).

2. В процессе эмбриогенеза легких и окончательных почек крыс контрольной группы происходит постоянная перестройка лектин-рецепторных систем.

3. Введение парацетамола и нимесулида беременным крысам приводит к измененной, по сравнению с нормой, перестройке количества и гистотопографии гликополимеров – рецепторов лектинов сои, арахиса и клещевины.

4. Наиболее сильно на гистотопографию и количество рецепторов лектинов сои, арахиса и клещевины в легких влияет терапевтическая и токсическая доза парацетамола и токсическая доза нимесулида. В окончательных почках аналогичное влияние имеет терапевтическая доза парацетамола и токсическая доза нимесулида.

#### **Перспективы дальнейших исследований**

Сравнительное изучение особенностей становления углеводного обмена в структурах легких и почек эмбрионов крыс, использование лектинов как структурно-функциональных зондов и сопоставление этих данных с особенностями содержания РНК, гликогена и гликопротеинов в цитоплазме клеток дыхательной системы и почек эмбрионов крыс способствует выяснению значения и характера трансформации углеводных де-

### Литературные источники

Абрамченко В. В. Перинатальная фармакология / В. В. Абрамченко. – СПб. : Logos, 1994. – 463 с.

Антонюк В. О. Лектини та їх сировинні джерела / Антонюк В. О. – Львів : Кварт, 2005. – 554 с.

Бегг Э. Клиническая фармакология / Бегг Э.; [пер. с англ. Т. П. Мосоловой]. - М. : Бином. Лаборатория знаний, 2004. – 104 с.

Волошин Н. А. Лектины животного и растительного происхождения: роль в процессах морфогенеза / Н. А. Волошин, Е. А. Григорьева // Теоретична медицина. Журн. АМН України. – 2005. – Т. 11, № 2. – С. 223-237.

Зарицкая И. С. Особенности медикаментозной терапии ЛОР-заболеваний во время беременности : [обзор литературы] / И. С. Зарицкая // Жіночий лікар. – 2007. – № 4. – С. 32-35.

Луцик А. Д. Лектины в гистохимии / Луцик А. Д., Детюк Е. С., Луцик М. Д. – Львов : Вища школа, 1989. – 139 с.

Bog-Hansen T. C. Lectin biology, biochemis-

try, clinical biochemistry / T. C. Bog-Hansen, G. A. Spengler // Proc. V. Lectin. Meeting. – Berlin, 1983. – Vol. 3. – P. 87-415.

In utero exposure to nonsteroidal anti-inflammatory drugs: neonatal renal failure / D. Benini, V. Fanos, L. Cuzzolin [et al.] // *Pediatr. Nephrol.* – 2004. – Vol.19, № 2. – P. 232-234.

Long-term acetaminophen (paracetamol) treatment causes liver and kidney ultra-structural changes during rat pregnancy / J. A. Neto, R. M. Oliveira-Filho, M. J. Simoes [et al.] // *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* – 2004. – Vol. 31, № 3. – P. 221-224.

Neonatal end-stage renal failure associated with maternal ingestion of cyclooxygenase-type-2 selective inhibitor nimesulide as tocolytic / L. Peruzzi, B. Gianoglio, M. G. Porcellini [et al.] // *Lancet.* – 1999. – Vol. 354, № 91-90. – P. 1615.

Renal tubular dysgenesis associated with in utero exposure to Nimesulide / U. S. Ali, S. Khubchandani, P. Andankar [et al.] // *Pediatr. Nephrol.* – 2006. – Vol. 21, № 2. – P. 274-276.

**Харченко С.В., Шаповалова О.Ю. Лектиногістохімічне дослідження ембріогенезу легень та нирок шурів, що проходить за умов відсутності видимих пошкоджуючих факторів та під впливом парацетамолу і німесулід.**

**Резюме.** Вивчено 467 зародків шурів у віці з 13-х по 22-у добу пренатального розвитку, що протікав за відсутності видимих пошкоджуючих чинників та під впливом терапевтичної, субтоксичної, токсичної дози парацетамолу і німесулід. Зрізи обробляли набором з трьох лектинів, кон'югованих з пероксидазою хрому. Встановлено, що в клітинах та неклітинному матриці легень та метанефросу плодів шурів контрольної групи містяться глікополімери рицини, арахісу і сої. В процесі ембріогенезу легень та постійної нирки шурів контрольної групи відбувається постійна перебудова лектин-рецепторних систем. Введення парацетамолу і німесулід вагітним щурам призводить до зміненої, в порівнянні з нормою, перебудови кількості і гістотопографії глікополімерів – рецепторів лектинів сої, арахісу і рицини. Найсильніше на гістотопографію та кількість рецепторів лектинів сої, арахісу і рицини в легенях впливає терапевтична і токсична доза парацетамолу і токсична доза німесулід. У постійних нирках аналогічний вплив має терапевтична доза парацетамолу і токсична доза німесулід.

**Ключові слова:** ембріогенез щура, легені, нирки, парацетамол, німесулід, лектини.