

Н.О.Амбарова

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

**Ключові слова:** лектинова гістохімія, нирка щура, постнатальний морфогенез, діабетична нефропатія.

Надійшла: 12.04.2008  
Прийнята: 27.05.2008

## ПЕРЕБУДОВА СІАЛОГЛІКАНІВ НИРКИ ЩУРА У ПОСТНАТАЛЬНОМУ МОРФОГЕНЕЗІ ТА ПРИ СТРЕПТОЗОТОЦИН-ІНДУКОВАНІЙ ДІАБЕТИЧНІЙ НЕФРОПАТІЇ

**Резюме.** З використанням 9 лектинів різної вуглеводної специфічності (SNA, WGA, RCA, PNA, VAA, CABA-2, SJA, SBA, HPA) проведено гістохімічне дослідження сіалогліканів нирки щура в динаміці постнатального морфогенезу та в процесі розвитку експериментальної стрептозототин-індукованої діабетичної нефропатії. Матеріал фіксували у 4% нейтральному формаліні та заливали у парафін. Вуглеводні детермінанти глікополімерів виявляли кон'югатами лектинів з пероксидазою хрому та наступною візуалізацією діамінобензидином. Постнатальний морфогенез нирки супроводжувався накопиченням сіалогліканів у поєднанні з редукцією кінцевих залишків DGal та DGalNAc, зростанням гетерогенності її окремих структурних компонентів. На 60-у постнатальну добу виявлено підвищену експресію нирковими тільцями, щіточковою облямівкою ниркових трубочок зовнішньої мозкової речовини рецепторів лектинів WGA та RCA, клітинами кортикальних ниркових трубочок – рецепторів SBA та HPA, що свідчило про набуття органом дефінітивних ознак. Розвиток діабетичної нефропатії супроводжувався тенденцією до накопичення глікополімерів з кінцевими залишками DGal та DGalNAc у поєднанні з редукцією сіалогліканів, підвищеним контуруванням щіточкової облямівки ниркових трубочок відповідними гістоспецифічними лектинами.

**Морфологія.** – 2009. – Т. III, № 3. – С. 21-31.  
© Н.О.Амбарова, 2009

**Ambarova N.O. Rearrangement of rat kidney sialoglycans during postnatal morphogenesis and in streptozotocin-induced diabetic nephropathy.**

**Summary.** 9 lectins with different carbohydrate affinities (SNA, WGA, RCA, PNA, VAA, CABA-2, SJA, SBA, HPA) were used for histochemical investigation of rat kidney glycoconjugates during postnatal morphogenesis and in streptozotocin-induced diabetes mellitus. Tissue samples were fixed in 4% neutral formalin and embedded in paraffin. Carbohydrate determinants labeled with lectin-peroxidase conjugates were visualized by diaminobenzidine. Postnatal morphogenesis was accompanied by enhanced sialic acid and reduced DGal/ DGalNAc expression, increased heterogeneity of kidney components. On postnatal day 60 was revealed selective labeling of renal corpuscles, tubules of outer medulla with WGA and RCA, and of cortical tubules with SBA and HPA, these signs presumably witnessing organ maturation. Development of diabetic nephropathy was accompanied with the accumulation of glycoconjugates with terminal DGal/ DGalNAc and reduced sialoglycan contents, increased labeling of renal tubules brush border with specific lectin markers.

**Key words:** lectin histochemistry, rat kidney, postnatal morphogenesis, diabetic nephropathy.

### Вступ

Сіалогліканам нирки належить важлива роль у гістофізіології сечоутворення. Так, перлекан та інші гепарансульфат-протеоглікани забезпечують від'ємну зарядженість, і, відповідно, зарядо-селективну проникність фільтраційної мембрани (Дедов І.І., Шестакова М.В., 2000; Бондарь І.А., Климонтов В.В., 2004). Сіалоглікопротеїни подопланін та подокаліксин подоцитів, мегалін епітеліоцитів проксимальних трубочок детермінують підтримання специфічного морфофункціонального статусу означених клітинних елементів (Ziak M., 1999; Ziak M. et al., 1999; Morelle W. et al., 2000; Zuber C. et al., 2003). У ширшому контексті сіалювані детермінанти тканин-

них біополімерів модулюють транспорт метаболітів через мембрани, можуть бути залучені до механізмів захисту від патогенних чинників (Scocco P., Pedini V., 2006), тому вивчення закономірностей становлення сіалогліканів нирки в онтогенезі, рівно ж як і їхньої перебудови при різних формах патології (діабетичної нефропатії зокрема), становить значний інтерес як для теоретичної, так і практичної медицини.

Чутливими й достатньо селективними маркерами вуглеводних детермінант біополімерів, у тому числі термінальних залишків сіалової (N-ацетил-нейрамінової, NeuNAc) кислоти, є лектини (Roth J. et al., 1987; Roth J., 1993), котрі ось уже близько 40 років з успіхом застосовуються в

різних ділянках гісто- та цитохімії (Луцик А.Д. та співавт., 1989; Волошин Н.А., 2004; Антонюк В.О., 2005; Lyons T.J. et al., 2007).

Вивченню сіалогліканів нирки, їх становленню та перерозподілу в постнатальному морфогенезі та при деяких видах патології, присвячена значна кількість робіт (Амбарова Н.О., Луцик О.Д., 2007; Амбарова Н.О. и соавт., 2008; Амбарова Н.О. и соавт., 2009; Charest P.M., Roth J., 1985; Roth J. et al., 1987; Taatjes D.J. et al., 1988; Holthofer H. et al., 1988; Wagner P., Roth J. et al., 1988; Lackie P.M. et al., 1990; Roth J., 1993; Kaneko Y. et al., 1995; Babal P. et al., 1996; Hofbauer J. et al., 2001; Zuber C. et al., 2003) однак даних стосовно змін сіалогліканів у динаміці розвитку діабетичної нефропатії в доступній літературі не виявлено.

#### Мета

З використанням лектинів різної вуглеводної специфічності дослідити експресію кінцевих залишків сіалової кислоти та десіалювання вуглеводних детермінант у динаміці постнатального морфогенезу нирки, а також, у порівняльному аспекті, у процесі розвитку стрептозотоніндукованої діабетичної нефропатії.

#### Матеріали та методи

Для вивчення характеру перерозподілу сіалогліканів були використані нирки 9 груп щурів лінії Вістар (по 3 особини у кожній групі, разом 27 тварин): на 1, 20, 60, 120 добу після народження, а також на 14, 30, 40, 60, 80 добу після доочеревинного введення стрептозотоніну (Sigma, США) з розрахунку 70 мг/кг маси тіла тварини. Розвиток діабету контролювали за рівнем глюкози, яку визначали глюкооксидазним методом з використанням реактивів фірми LaChema (Чехія) відповідно до інструкцій виробника. Свідченням розвитку цукрового діабету був рівень глюкози в крові у межах 10-18 ммоль/л. Утримання тварин та маніпуляції з ними проводилися у відповідності до положень "Загальних етичних принципів експериментів на тваринах", ухвалених I Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Щурів окремих експериментальних груп забивали шляхом декапітації після передозування ефірного наркозу. Гістологічні проби нирки фіксували у 4% нейтральному формаліні з наступною заливкою у парафін за стандартною методикою. Для отримання оглядових препаратів зрізи товщиною 5-7 мкм зафарбовували гематоксиліном і еозином, а також з використанням PAS-реакції. Оглядові препарати були використані для морфометричного аналізу окремих ниркових структур.

Набір використаних лектинів, їх міжнародні аббревіатури та вуглеводна специфічність подано у таблиці 1. Для більш повної характеристики перебудови вуглеводних детермінант ниркових структур, додатково до сіалоспецифічного лек-

тину SNA, було використано лектини зі змішаною афінністю, а також із спорідненістю до залишків DGal, DGalNAc та DGlcNAc, які можуть займати субтермінальні положення відносно залишків сіалової кислоти, і, відповідно, проявлятися при десіалюванні олігосахаридних детермінант (рис. 1).

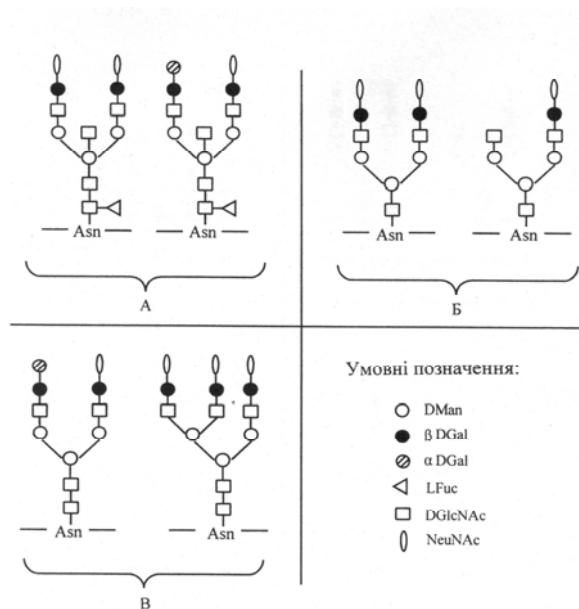


Рис. 1. Структура сіалюваних N-гліканів. А. Два з множинних варіантів олігосахаридних детермінант мегаліну нирки щура. Б. Ланцюги сіалозидів, очищених з сечі хворих лізосомальними хворобами, до яких виявляє максимальну афінність лектин RCA. В. Рецептори лектину SNA. За (Morelle W. et al., 2000) – А, та (Антонюк В.О., 2005) – Б, В.

Лектини були очищені та кон'юговані з пероксидазою хрому в лабораторії "Лектинотест" д. фарм. н. В.Антонюком. Візуалізацію місць зв'язування лектинів досягали з використанням в якості хромогена діамінобензидину тетрагідроклориду (Sigma, США) в присутності перекису водню як описано раніше (Луцик А.Д. та співавт., 1989). Оскільки в попередніх дослідженнях було встановлено, що афінність лектинів до тканинних глікополімерів перевищує величину їх спорідненості до відповідних інгібіторних моно- і дисахаридів (Луцик А.Д. та співавт., 1989), контроль специфічності гістохімічних реакцій здійснювали шляхом виключення лектин-пероксидазних кон'югатів зі схеми обробки гістологічних препаратів.

Мікроскопію і фотографування препаратів здійснено на мікроскопі Carl Zeiss Jena Ng, доукомплектованого цифровою фотокамерою Canon IXUS 700. Морфометричний аналіз проведено з використанням комп'ютерної програми Image Tools 2000 після попереднього фотографування в системі Aver Media.

## Перелік використаних лектинів та їх вуглеводна специфічність

№	Лектин, його міжнародна назва, абревіатура	Вуглеводна специфічність*	Структура комплементарного олігосахаридного фрагмента
1.	Лектин бузини чорної, <i>Sambucus nigra</i> agglutinin, SNA	NeuNAc( $\alpha$ 2-6)DGal	NeuNAc( $\alpha$ 2-6)Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-2)NeuNAc(2-6)Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc,
2.	Лектин зародків пшениці, Wheat germ agglutinin, WGA	DGlcNAc>NeuNAc	Man( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc
3.	Лектин рицини, <i>Ricinus communis</i> agglutinin, RCA	DGal>NeuNAc	NeuNAc(2-6)Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc
4.	Лектин арахісу, Peanut agglutinin, PNA	DGal	DGal( $\beta$ 1-3)GalNAc
5.	Лектин омели, <i>Viscum album</i> agglutinin, VAA	DGal	DGal( $\beta$ 1-3)Gal
6.	Лектин софори японської, <i>Sophora japonica</i> agglutinin, SJA	DGal	DGal( $\beta$ 1-3)Gal
7.	Лектин кори жовтої акації, <i>Caragana arborescens</i> bark agglutinin, CABA-2	DGalNAc>DGal	DGal( $\beta$ 1-4)GlcNAc
8.	Лектин виноградного слимака, <i>Helix pomatia</i> agglutinin, HPA	DGalNAc	GalNAc( $\alpha$ 1-3)GalNAc
9.	Лектин сої, Soybean agglutinin, SBA	$\alpha$ DGal-NAc> $\beta$ DGalNAc	GalNAc( $\alpha$ 1-3)Gal( $\beta$ 1-3)GalNAc

Примітка: \* Детальніше вуглеводна специфічність використаних лектинів схарактеризована у монографіях (Луцик А.Д., 1989; Антонюк В.О., 2005).

### Результати та їх обговорення

При зафарбовуванні гематоксиліном і еозинном нирки новонародженого щура у складі субкапсулярної кіркової речовини ідентифіковано ділянки метанефрогенної мезенхіми, кінцеві ампули та S-подібні тільця збірних ниркових проток. В глибині кіркової речовини, на межі з зовнішньою мозковою речовиною, виявлено поодинокі ниркові тільця, що служать віддзеркаленням процесів формотворення нових нефронів у напрямі від мозкової речовини до поверхні нирки (Гончаревская О.А., 1977). На 20-у добу кінцеві ампули, S-подібні тільця та метанефрогенні островці більше не виявлялися, трансформувалися на ниркові тільця; в проміжку між 20-ю та 60-ю добою продовжувалося видовження ниркових трубочок і набуття окремими популяціями нефроцитів гістохімічних ознак, характерних для дорослої тварини, що узгоджується з даними інших дослідників (Гончаревская О.А., 1977; Zuber C. et al., 2003), тоді як препарати нирки тварин на 60-у та 120-у постнатальну добу між собою істотно не відрізнялися.

На 14-у добу після введення стрептозотину на оглядових препаратах структура нирки була практично незмінною. На 30-у та 40-у добу досліду на тлі загальної гіпертрофії та набряків нефроцитів, звуження сечових просторів капсул нефронів, виявлені ділянки деструкції окремих нефронів. На 60-у та 80-у добу розвитку діабетичної нефропатії набряк паренхіми нирки, окремі

ділянки геморагій поєднувалися з гіаліново-крапельною дистрофією мезангіоцитів ниркових тілець, нефроцитів ниркових трубочок, атрофією та потоншенням збірних проток. Виявлені гістопатологічні зміни вписуються у загальну концепцію морфологічних маніфестацій розвитку діабетичної нефропатії за (Дедов И.И., Шестакова М.В., 2000).

*Результати морфометрії* представлені у таблиці 2. Як видно з наведених даних, у процесі постнатального морфогенезу мала місце тенденція до зменшення числа ниркових тілець на одиницю площі зрізу в поєднанні зі збільшенням об'єму сечового простору як у складі капсул індивідуальних нефронів, так і в органі загалом. Кореляція між густиною ниркових тілець та величиною їх сечового простору носила слабкий обернений характер ( $r=-0,52$ , при  $p<0,05$ ), проте, у порівнянні з сумарною величиною площі сечового простору, на стандартній площі зрізу мала сильний обернений характер ( $r=-0,96$ , при  $p<0,05$ ). Це явище можна пояснити триваючим від моменту народження аж до досягнення цілковитої зрілості видовженням ниркових трубочок і збірних проток, що узгоджується з даними (Гончаревская О.А., 1977), а також збільшенням об'єму фільтрації.

Розвиток діабетичної нефропатії супроводжувався деяким збільшенням густини ниркових тілець на ранніх етапах (14-а доба) після ін'єкції стрептозотину, що може бути обумовлено



ущільненням стромальних і паренхіматозних компонентів нирки, з поступовим поверненням до контрольних показників на 80-у добу, ймовірно, внаслідок набряку тканин нирки. Об'єм сечового простору окремих ниркових тілець і органа в цілому був достовірно меншим у порівнянні з контрольними показниками, що може бути

пов'язано з діабет-індукованим підвищенням рівня реабсорбції. У динаміці розвитку цукрового діабету виявлена повна кореляція ( $r=1$ ) між густиною ниркових тілець та сумарною величиною площі сечового простору на стандартній площі зрізу, що вказує на достовірне зниження обох показників ( $p<0,05$ ).

Таблиця 2

Результати морфометричного аналізу ниркових тілець

	Густина ниркових тілець на площі зрізу S* (M±m)	Площа сечового простору 1 ниркового тільца** (M±m), мкм <sup>2</sup>	Сумарна площа сечового простору на площі зрізу S, мкм <sup>2</sup>
Постнатальний онтогенез			
1 доба	39,55±3,99	508,08±29,76	20094,56
20 доба	21,20±1,91	1248,93±106,62	26477,32
60 доба	13,70±1,49	1941,79±130,98	26602,52
120 доба	13,00±1,26	2067,33±109,09	26875,29
Після ін'єкції стрептозоточину			
14 доба	17,13±1,08	1497,58±82,08	25653,55
30 доба	15,55±1,06	1524,39±83,29	23704,27
80 доба	13,15±0,87	1594,07±100,97	20962,02

Примітки: \*S = 2,61 мм<sup>2</sup>, обрахунки здійснені при збільшенні  $\times 120$ .  
\*\* - обрахунки здійснені при збільшенні  $\times 300$ .

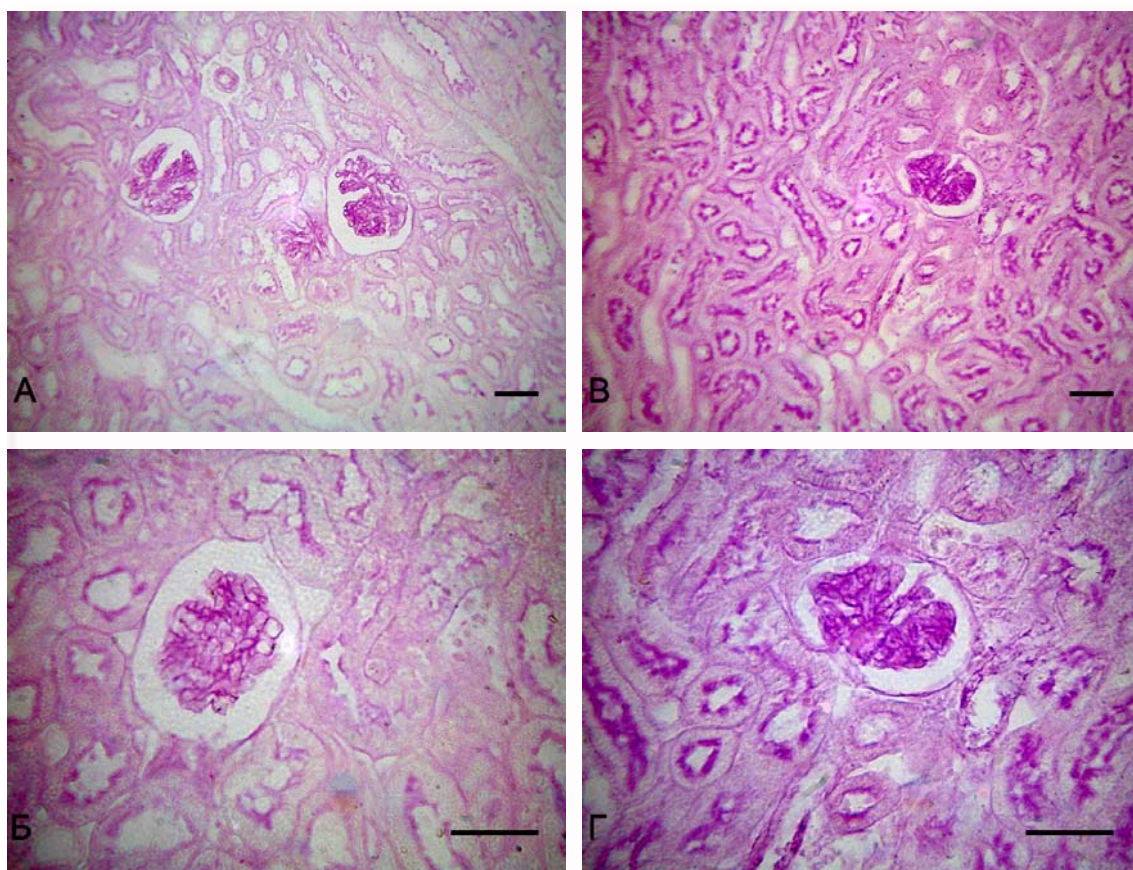


Рис. 2. PAS-реактивність структур нирки на 60-у добу постнатального онтогенезу (А, Б) та на 30-у добу розвитку діабетичної нефропатії (В, Г): зростання інтенсивності забарвлення ниркових тілець та щіткової облямки проксимальних трубочок.  $\times 140$  (А, В) та  $\times 280$  (Б, Г), масштабний відрізок – 50 мкм.



**Результати PAS-реакції.** В нирці новонародженого щура виявлено реактивність люменальної поверхні кортикальних збірних проток, щіткової облямівки ниркових трубочок та базальної мембрани клубочків; кінцеві ампули, S-подібні тілця та ділянки метанефрогенної мезенхіми були PAS-негативні. Починаючи від 20-ї постнатальної доби аж до досягнення органом повної зрілості, задокументовано поступове наростання реактивності клубочкового апарату, щіткової облямівки трубочок зовнішньої мозкової речовини, базальної мембрани збірних ниркових проток. На 60-у постнатальну добу ниркові тілця практично не відрізнялися від таких у дорослих тварин (рис. 2А, Б). У цій же віковій групі, а також на 120-у постнатальну добу реактивність щіткової облямівки ниркових трубочок зовнішньої мозкової речовини виразно переважала реактивність аналогічних елементів у складі кори нирки. Означені закономірності можна трактувати як ознаки досягнення ниркою щура морфологічної зрілості до 60-ї постнатальної доби.

Розвиток діабетичної нефропатії супро-

джувався деяким зниженням реактивності PAS-позитивних структур на 14-у добу з переходом до їх підвищеної реактивності у наступних дослідних групах (рис. 2В, Г). Привертала увагу дезінтеграція щіткової облямівки ниркових трубочок. Отримані результати свідчать про перебудову глікопротеїнів та гліколіпідів нирки (субстрат PAS-реакції) як у процесі постнатального морфогенезу, так і про їх залучення до патомеханізмів розвитку діабетичної нефропатії. Використання PAS-реакції не дозволило нам виявити описаних у літературі (LeHir M., Dubach U.C., 1982) тинкторіальних відмінностей окремих сегментів нефронів, що, можливо, пов'язано з особливостями використаних у нашій роботі умов фіксації та подальшої обробки гістологічного матеріалу.

**Лектин бузини чорної (SNA).** У нирці новонародженого щура рецептори лектину SNA концентрувались на люменальній поверхні збірних проток, кінцевих ампул та S-подібних тілець, у складі щіткової облямівки ниркових трубочок при повній ареактивності метанефрогенної мезенхіми та клубочкового апарату (рис. 3А).

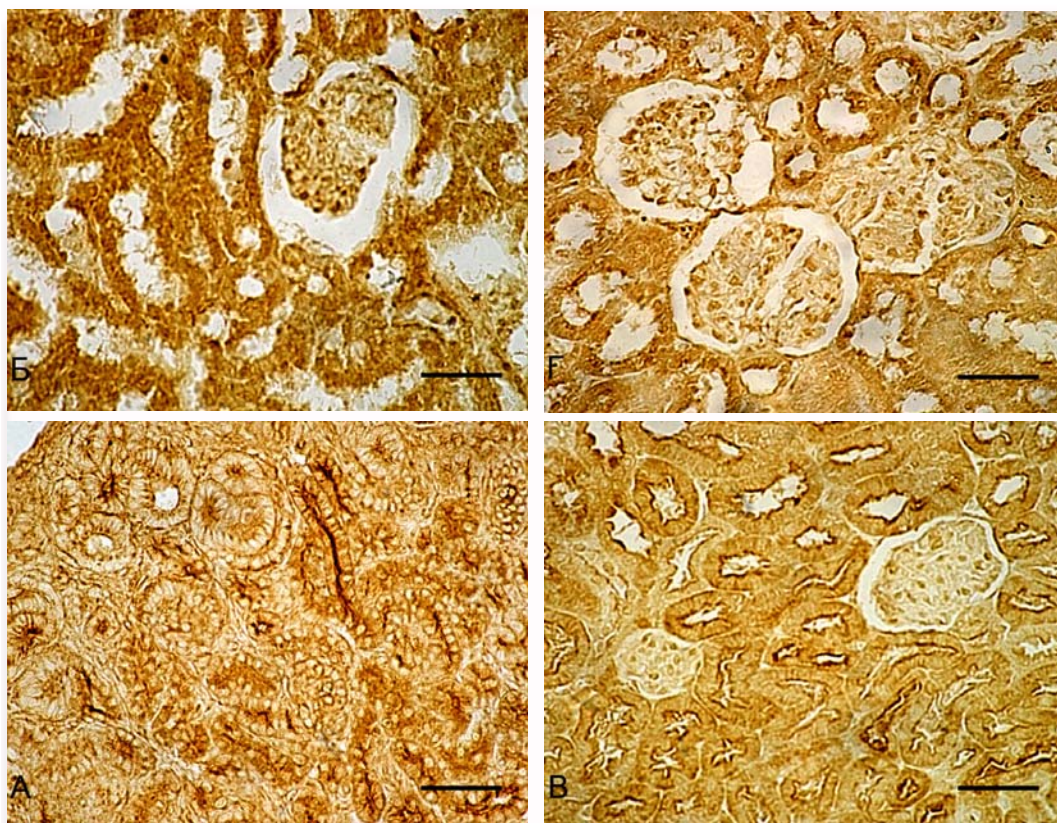


Рис. 3. Перерозподіл рецепторів лектину SNA в онтогенезі (А, Б) та при прогресії діабетичної нефропатії (В, Г). А. Нирка щура на 1-у постнатальну добу: концентрація рецепторів SNA на люменальній поверхні збірних проток, кінцевих ампул та S-подібних тілець, між якими локалізуються ареактивні ділянки метанефрогенної мезенхіми. Б. 120-а постнатальна доба: значна реактивність цитоплазматичних глікокон'югатів нефроцитів, базальної мембрани, ядер подоцитів та мезангіоцитів ниркових тілець. В. 14-а доба після ін'єкції стрептозоточину: редукція реактивності паренхіматозних елементів у поєднанні з контуруванням щіткової облямівки ниркових трубочок, загальним ущільненням строми і паренхіми нирки. Г. 80-а доба після ін'єкції стрептозоточину: деяке посилення реактивності ниркових структур, дезінтеграція щіткової облямівки нефроцитів.  $\times 280$ , масштабний відрізок – 50 мкм.

На 20-у постнатальну добу виявлено зростання реактивності люменальної поверхні збірних проток, накопичення сіалогліканів у складі глікополімерів ядер та супрануклеарній зоні окремих клітин, що свідчить про гетерогенність епітеліального вистелення збірних проток. У цій же віковій групі вперше виявлено реактивність подоцитів та мезангіоцитів ниркових тілець, яка посилювалась на 60-у та 120-у добу (рис. 3Б). У процесі постнатального морфогенезу нирки мала місце тенденція до накопичення та генералізації SNA-реактивних глікополімерів у складі структурних елементів її паренхіми. При моделюванні діабетичної нефропатії якісних змін рецепторів лектину SNA не виявлено, хоча мала місце загальна тенденція до зменшення реактивності ниркових структур. На 14-у та 80-у добу після ін'єкції стрептозоточину на тлі редукції реактивності паренхіматозних елементів нирки задокументовано контурування щіткової облямівки кортикальних ниркових трубочок (рис. 3В, Г); клітини збірних проток внутрішньої мозкової речовини демонстрували гетерогенність зв'язування лектину. *Лектин зародків пшениці (WGA)*. Характер гістотопографії та перерозподілу рецепторів лектину WGA упродовж постнатального онтогенезу загалом був подібний до описаного вище для SNA (рис. 4А-Г). Відмінність між цими лектинами проявлялась у підвищеній спорідненості WGA до фільтраційної мембрани ниркових тілець починаючи з 20-ї постнатальної доби, тоді як лектин SNA виявляв підвищену афінність до подоцитів та мезангіоцитів. Окрім того, на 60-у та 120-у постнатальну добу лектин WGA більш інтенсивно контурував щіткову облямівку ниркових трубочок зовнішньої мозкової речовини. Означені відмінності можуть бути пов'язані з тим, що окрім сілової кислоти лектин WGA виявляє афінність також до залишків DGlcNAc, експресія яких, очевидно, починається на 20-у та 60-у добу відповідно на фільтраційній мембрані та щітковій облямівці нефроцитів. При моделюванні цукрового діабету мала місце загальна тенденція до зменшення та генералізації реактивності ниркових структур з лектином WGA. На 14-у та 80-у добу експерименту було задокументовано значне підвищення експресії рецепторів WGA щітковою облямівкою ниркових трубочок зовнішньої мозкової речовини (рис. 4Д-Ж).

*Лектин рицини (RCA)*. Особливість цього лектину у порівнянні з лектином WGA полягала у дещо пізнішому (на 60-у постнатальну добу) маркуванні ниркових тілець. Привертало також увагу інтенсивне контурування щіткової облямівки ниркових трубочок зовнішньої мозкової речовини на 60-ту та 120-у добу нормального морфогенезу нирки, а також у процесі розвитку діабетичної нефропатії. Остання супроводжувалась редукцією зв'язування RCA зі структурами

паренхіми нирки.

*Лектин арахісу (PNA)*. У нирці новонародженого щура лектин PNA виявляв афінність до цитоплазматичних глікокон'югатів ниркових трубочок та збірних проток при повній ареактивності клубочків, кінцевих ампул та S-подібних тілець. Клітини збірних проток демонстрували гетерогенність зв'язування. У наступних вікових групах реактивність ниркових структур з лектином PNA редукувалась і ставала більш генералізованою у цитоплазмі нефроцитів. При моделюванні діабетичної нефропатії мала місце тенденція до нагромадження рецепторів PNA, що особливо чітко проявлялося на 14-у та 30-у добу експерименту в контуруванні люменальної поверхні збірних проток кіркової речовини.

*Лектин омели (VAA)*. На 1-у постнатальну добу лектин вибірково зв'язувався з глікополімерами в апікальній частині клітин ниркових трубочок зовнішньої мозкової речовини, а також люменальною поверхнею збірних проток, причому для останніх була характерною гетерогенна реактивність. У наступні терміни розвитку починали маркуватися ниркові тільця (20-а доба), щіткова облямівка проксимальних трубочок кіркової та зовнішньої мозкової речовини (60-а доба), з тенденцією до накопичення та генералізації рецепторів VAA у цитоплазмі нефроцитів на 120-у добу. Впродовж розвитку діабетичної нефропатії, на фоні загальної редукції реактивності паренхіми нирки, підсилено контурувалась щіткова облямівка ниркових трубочок кіркової речовини. Як видно із наведених даних, лектини PNA та VAA хоча і мають близьку вуглеводну специфічність, за характером зв'язування зі структурними компонентами нирки досить істотно відрізняються.

*Лектини кори жовтої акації (CABA-2) та софори японської (SJA)* у загальних рисах відтворювали картину зв'язування, описану вище для лектину омели.

*Лектини сої (SBA) та виноградної слимака (HPA)* у нашому дослідженні характеризувалися практично ідентичною гістохімічною специфічністю. Впродовж постнатального морфогенезу нирки експресія рецепторів цих лектинів виразно змінювалась. Так, на 1-у постнатальну добу ідентифіковано контурування люменальної поверхні збірних проток, кінцевих ампул, S-подібних тілець, ниркових трубочок зовнішньої мозкової речовини (рис. 5А). На 20-у добу на фоні загального зменшення реактивності паренхіми нирки, лектини SBA та HPA виявляли афінність до люменальної поверхні збірних проток та трубочок внутрішньої мозкової речовини. На 60-у та 120-у добу на тлі ареактивності клубочкового апарату та паренхіматозних елементів нирки слабо маркувалися щіткова облямівка нефроцитів кіркової речовини та люменальна поверхня збірних



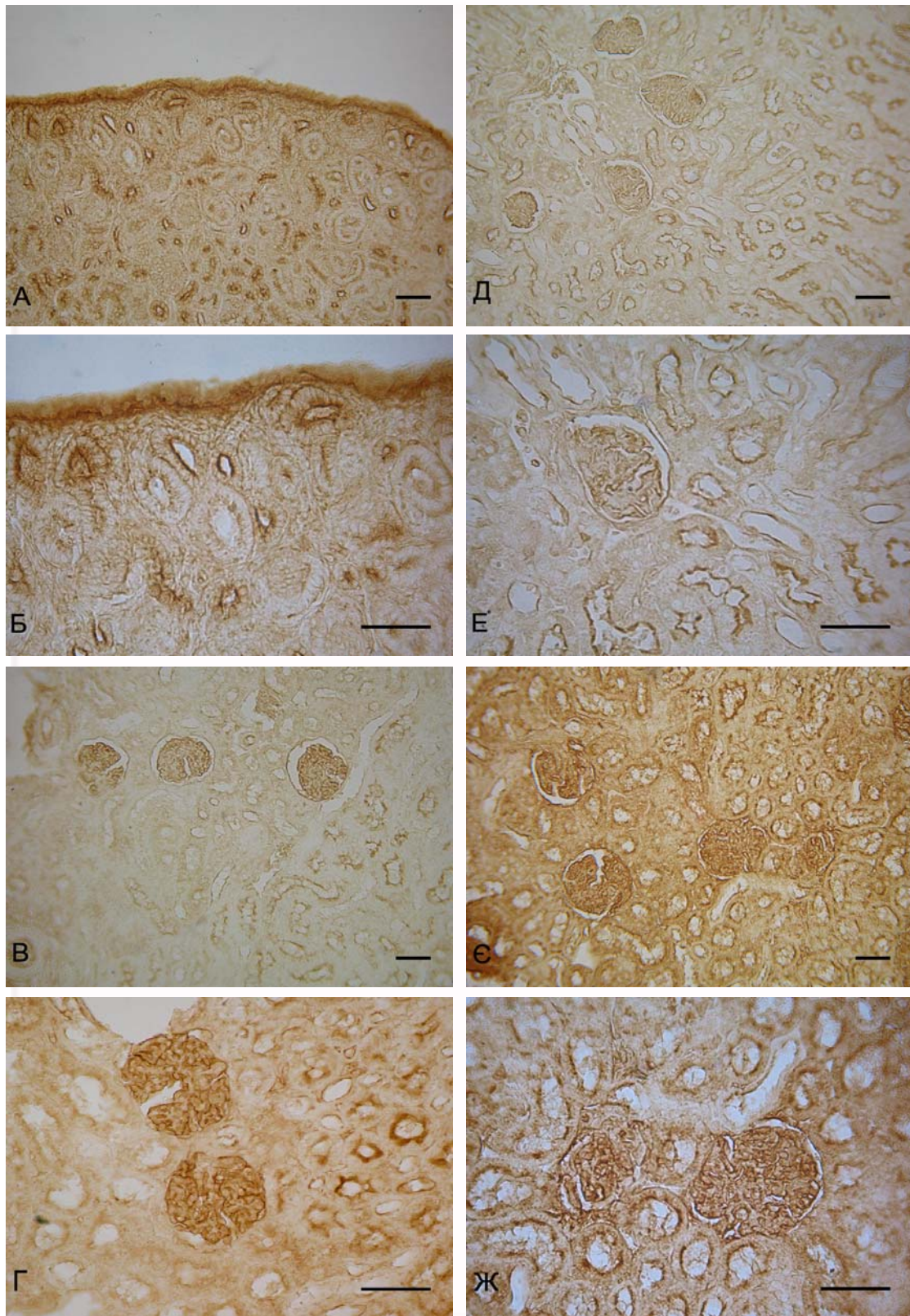


Рис. 4. Реактивність структурних елементів нирки з лектином WGA. А, Б. 1-а постнатальна доба: контурування люменальної поверхні збірних проток, кінцевих ампул та S-подібних тілець. В, Г. 120-а постнатальна доба: значна реактивність базальної мембрани ниркових тілець, щітчастої облямівки ниркових трубочок зовнішньої мозкової речовини. Д, Е. 14-а доба після ін'єкції стрептозотозину: редукція реактивності паренхіми у поєднанні з посиленням контурування щітчастої облямівки ниркових трубочок. Є, Ж. 80-а доба після ін'єкції стрептозотозину: посилення реактивності ниркових тілець, контурування та дезінтеграція щітчастої облямівки нефроцитів.  $\times 140$  (А, В, Д, Є) та  $\times 280$  (Б, Г, Е, Ж), масштабний відрізок – 50 мкм.



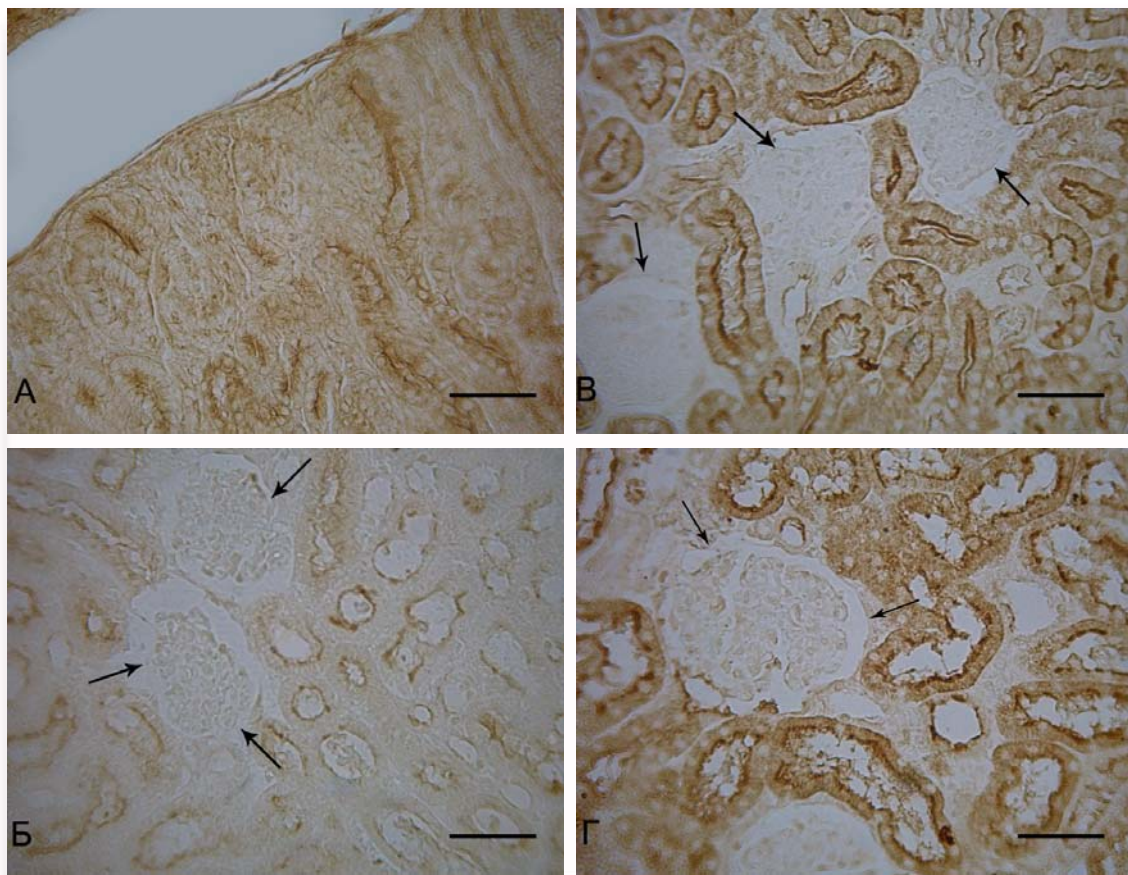


Рис. 5. Гістотопографія рецепторів лектину SBA. А. 1-а постнатальна доба: контурування люменальної поверхні збірних проток, кінцевих ампул та S-подібних тілець. Б. 120-а постнатальна доба: слабке контурування щіткової облямівки нефроцитів, повна ареактивність ниркових тілець (стрілки). В. 14-а доба після ін'єкції стрептозотозину: посилене контурування щіткової облямівки, зростання реактивності цитоплазматичних глікокон'югатів нефроцитів на тлі ущільнення строми та паренхіми нирки; ниркові тільця (стрілки) та ядра нефроцитів ареактивні. Г. 80-а доба після ін'єкції стрептозотозину: подальше накопичення SBA-реактивних глікополімерів у складі дезінтегрованої щіткової облямівки, цитоплазмі нефроцитів; ниркові тільця (стрілки) та ядра нефроцитів ареактивні.  $\times 280$ , масштабний відрізок – 50 мкм.

проток внутрішньої мозкової речовини (рис. 5Б). Розвиток діабетичної нефропатії супроводжувався накопиченням рецепторів SBA та HPA у складі щіткової облямівки та цитоплазматичних глікокон'югатів клітин кортикальних ниркових трубочок, збірних проток мозкової речовини (рис. 5В, Г).

Методи лектинової гістохімії дозволяють отримати об'єктивну характеристику якісного складу вуглеводних детермінант тканинних структур та прослідкувати динаміку їх змін як у фізіологічних умовах, так і при патології. Спроби кількісної оцінки вмісту лектинових рецепторів значною мірою носять суб'єктивний характер, оскільки інтенсивність гістохімічної реакції залежить від товщини зрізу, часу його інкубації у проявнику, інших чинників, а її оцінка – від чутливості ока спостерігача. Якщо в межах одного зрізу кількісне порівняння реактивності окремих структур можна вважати коректним, то для кількісної характеристики окремих зрізів, а надто окремих препаратів, навіть використання фотоденситометрії навряд чи може дати достатньо

об'єктивні дані. У таких випадках краще говорити не про абсолютні кількісні показники, а лише про тенденцію чи напівкількісну оцінку: саме таку термінологію було використано у цій роботі.

Проведені дослідження продемонстрували значні відмінності складу глікокон'югатів нирки новонароджених щурів і дорослих тварин. Так, у процесі постнатального морфогенезу нирки було виявлено загальну тенденцію до накопичення у складі її структурних компонентів PAS-реактивного матеріалу, посилення експресії рецепторів лектинів SNA, WGA, RCA у поєднанні з редукцією рецепторів PNA, VAA, CABA-2, SJA, SBA, HPA. Означений феномен можна пояснити маскуванням типових для ембріональних тканин вуглеводних детермінант DGal та DGalNAc залишками сілової кислоти чи DGlcNAc. Подібну тенденцію виявили у своїх дослідженнях також інші автори (Holthofer H. et al., 1988).

Постнатальне ускладнення морфології нирки корелювало зі зростанням гістохімічної гетерогенності окремих її компонентів. Зокрема, бу-



ло задокументовано експресію нирковими тільцями рецепторів WGA на 20-у добу, рецепторів RCA – на 60-у добу. У цій же віковій групі вперше ідентифіковано підвищену вибірккову афінність клітин кортикальних ниркових трубочок до лектинів SBA та HPA, щіткової облямівки ниркових трубочок зовнішньої мозкової речовини – до WGA та RCA. Набуті у ході морфогенезу вуглеводні маркери закріплювались і проявлялися у дорослих тварин. Судячи з отриманих даних, гістохімічних ознак дефінітивного органа нирка щура набуває у проміжку між 20-ю та 60-ю постнатальною добою.

Маркування лектином WGA ниркових тілець починаючи від 20-ї постнатальної доби нагадувало описане раніше маркування тих самих структур лектином гриба міцени, що проявляє афінність до залишків DMan/ DGlc та DGlcNAc (Амбарова Н.О. і соавт., 2008). Означений феномен може бути свідченням важливої ролі глікополімерів зі спільними для зв'язування обох лектинів детермінантами DGlcNAc у становленні фільтраційного бар'єру нирки щура. Описані вище закономірності корелювали з виявленням нами раніше накопиченням у ході постнатального морфогенезу нирки манозо- та фукозогліканів, зростанням гетерогенності вуглеводних детермінант її окремих структурних компонентів (Амбарова Н.О. і соавт., 2008; Амбарова Н.О. і соавт., 2009).

Розвиток діабетичної нефропатії супроводжувався деяким підвищенням PAS-реактивності ниркових тілець та щіткової облямівки ниркових трубочок, а також зворотною у порівнянні з постнатальним морфогенезом тенденцією до накопичення рецепторів PNA, SBA, HPA та редукцією рецепторів SNA, WGA, RCA, що можна пояснити порушенням кінцевих етапів глікозування (а саме, сіалювання) синтезованих нефроцитами глікополімерів. У попередніх дослідженнях (Амбарова Н.О. і соавт., 2008; Амбарова Н.О. і соавт., 2009) було також показано, що розвиток діабетичної нефропатії супроводжується редукцією термінальних залишків манози та фукози, що у поєднанні із задокументованою у цій роботі редукцією сіалогліканів, ймовірно, є віддзеркаленням індукованої діабетом загальної тенденції до незавершеності при діабеті кінцевих етапів глікозилювання синтезованих нефроцитами глікополімерів (неприєднання залишків Man/ Glc, Fuc, NeuNAc до субтермінальних залишків DGal та DGalNAc).

З літератури відомо, що розвиток діабетичної нефропатії супроводжується втратою нирковими структурами глікозаміногліканів та протеогліканів (зокрема, гепарансульфат протеоглікану) внаслідок як порушень їхнього синтезу, так і

посиленого вимивання (Дедов І.І., Шестакова М.В., 2000; Бондарь І.А., Климонтов В.В., 2004). Отримані нами результати доповнюють і уточнюють патогенетичні механізми такої втрати. Подібна, обумовлена метаболічним дисбалансом, незавершеність кінцевого глікозилювання при експериментальному гіпо- та гіпертироїдизмі описана раніше в слинних залозах щурів (Луцик А.Д. і соавт., 1989).

Своєрідною маніфестацією діабет-індукованих змін в експресії ниркових глікокон'югатів виявилось підвищене контурування щіткової облямівки кортикальних ниркових трубочок лектинами SBA та HPA, трубочок зовнішньої мозкової речовини – лектинами WGA та RCA. Підвищене контурування щіткової облямівки корелювало зі зменшенням сечового простору ниркових тілець, і, ймовірно, було гістохімічним віддзеркаленням посиленого синтезу нефроцитами глікополімерів, що забезпечують характерний для діабетичної нефропатії підвищений рівень реабсорбції (Дедов І.І., Шестакова М.В., 2000). Особливо вираженим означене контурування було на 14-у та 80-у добу після ін'єкції стрептозотоцину, що можна розцінити як наслідки первинного метаболічного стресу на 14-у добу та зриву адаптаційно-компенсаторних механізмів на 80-у добу досліду.

#### Висновки

1. Аналіз даних лектинової гістохімії дозволяє стверджувати, що набуття ниркою щура дефінітивних ознак не завершується до 20-ї постнатальної доби, як вважалося раніше, а продовжується у проміжку між 20-ю та 60-ю добою.

2. У процесі постнатального морфогенезу виявлена тенденція до накопичення у складі структурних компонентів нирки сіалогліканів (рецепторів лектинів SNA, WGA, RCA) у поєднанні з маскуванням вуглеводних детермінант DGal/ DGalNAc (редукція рецепторів PNA, VAA, CABA-2, SJA, SBA, HPA).

3. Ідентифіковано вибірккову експресію нирковими тільцями рецепторів лектину WGA на 20-у постнатальну добу, рецепторів RCA – на 60-у добу; ці ж лектини проявляли підвищену афінність до ниркових трубочок зовнішньої мозкової речовини, тоді як селективними маркерами кортикальних ниркових трубочок виявилися лектини SBA та HPA.

4. Розвиток діабетичної нефропатії супроводжувався редукцією у складі структурних компонентів нирки сіалогліканів (рецепторів лектинів SNA, WGA, RCA), накопиченням рецепторів лектинів PNA, SBA, HPA у поєднанні з підвищеною експресією щітковою облямівкою ниркових трубочок рецепторів відповідних гістоспецифічних лектинів.

Амбарова Н. О. Манозоглікани нирки щура в динаміці постнатального онтогенезу та при стрептозотин-індукованому цукровому діабеті: гістохімічне дослідження з використанням лектинів Con A, LCA, PSA та нового лектину з гриба Міцени чистої (MPFA) / Амбарова Н.О., Антонюк Р.В., Луцик О.Д. // Світ біол. мед. – 2008. – № 4. – С. 95-103.

Амбарова Н. О. Фукозоглікани нирки щура: перерозподіл в динаміці постнатального онтогенезу та у процесі розвитку стрептозотин-індукованого цукрового діабету / Амбарова Н.О., Антонюк В.О., Луцик О.Д. // Клін. анат. опер. хірург. – 2009. – Т. 8, № 1. – С. 15-21.

Амбарова Н. О. Характер зв'язування лектинів різної вуглеводної специфічності з глікополімерами нирки новонароджених щурів / Амбарова Н.О., Луцик О.Д. // Acta Med. Leopold. – 2007. – Т. 13, № 4. – С. 59-66.

Антонюк В. О. Лектини та їх сировинні джерела / Антонюк В.О. – Львів : Кварт, 2005. – 431 с.

Бондарь И. А. Гликозаминогликаны и диабетическая нефропатия / Бондарь И.А., Климонтов В.В. // Пробл. эндокринол. – 2004. – Т. 50, № 2. – С. 29-34.

Волошин Н. А. Использование лектиновой гистохимии в морфологии / Волошин Н.А., Григорьева Е.А., Довбыш М.А. // Таврич. мед. биол. вестн. – 2004. – Т. 7, № 4. – С. 40-41.

Гончаревская О. А. Интракортикальные и юкстамедуллярные нефроны почки в постнатальном онтогенезе крысы / Гончаревская О.А. // Арх. анат. – 1977. – Т. 72, № 6. – С. 20-26.

Дедов И. И. Диабетическая нефропатия / Дедов И.И., Шестакова М.В. – Москва : Универсум, 2000. – 234с.

Луцик А. Д. Лектины в гистохимии / Луцик А.Д., Детюк Е.С., Луцик М.Д. – Львов : Вища школа, 1989. – 214 с.

Babal P. Sialic acid expression in normal and diseased human kidney / Babal P., Slugen I., Danis D. [et al.] // Acta histochem. – 1996. – Vol. 98, № 1. – P. 71-77.

Characterization of the N-linked oligosaccharides of megalin (gp330) from rat kidney / Morelle W., Haslam S. M., Ziak M. [et al.] // Glycobiology. – 2000. – Vol. 10, № 3. – P. 295-304.

Charest P. M. Localization of sialic acid in kidney glomeruli: regionalization in the podocyte plasma membrane and loss in experimental nephrosis / Charest P. M., Roth J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1985. – Vol. 82, № 24. – P. 8508-8512.

Elderberry bark lectin-gold techniques for the detection of Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc sequences: applications and limitations / Taatjes D. J., Roth J., Peumans W., Goldstein I. J. // Histochem. J. – 1988. – Vol. 20. – P. 478-490.

Expression of Galβ1,4GlcNAc α2,6-sialyltransferase and α2,6-linked sialoglycoconjugates in normal human and rat tissues / Kaneko Y., Yamamoto H., Colley K. J., Moskal J. R. // J. Histochem. cytochem. – 1995. – Vol. 43, № 9. – P. 945-954.

Hofbauer J. N-acetyl-neuraminic acid: a potential key in renal calculogenesis / Hofbauer J., Fang-Kircher S., Steiner G. // Urol. Res. – 2001. – Vol. 26, № 1. P. 49-56.

Holthofer H. Glomerular sialoconjugates of developing and mature rat kidneys / Holthofer H., Hennigar R. A., Schulte B. A. // Cell Differ. – 1988. – Vol. 24, № 3. – P. 215-221.

Identification of megalin as the sole rat kidney sialoglycoprotein containing polyα2,8-deaminoneuraminic acid / Ziak M., Kerjaschki D., Farquhar M. G., Roth J. // J. Am. Soc. Nephrol. – 1999. – Vol. 10. – P. 203-209.

Lackie P. M. Polysialic acid and N-CAM expression in embryonic rat kidney: mesenchymal and epithelial elements show different patterns of expression / Lackie P. M., Zuber C., Roth J. // Development. – 1990. – Vol. 110. – P. 933-947.

Lectin and other histochemical studies of the articular cartilage and the chondro-osseous junction of the normal human knee joint / Lyons T. J., Stoddart R. W., McClure S. F., McClure J. // J. Mol. Hist. – 2007. – Vol. 38. – P. 13-23.

LeHir M. The cellular specificity of lectin binding in the kidney I. A light microscopical study in the rat / LeHir M., Dubach U. C. // Histochemistry. – 1982. – Vol. 74. – P. 521-530.

Polysialic acid units are spacially and temporally expressed in developing postnatal rat kidney / Roth J., Taatjes D., Bitter-Suermann D., Finne J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1987. – Vol. 84. – P. 1969-1973.

Roth J. Cellular sialoglycoconjugates: a histochemical perspective / Roth J. // Histochem. J. – 1993. – Vol. 25. – P. 687-710.

Scocco P. Equine mandibular gland: in situ characterisation of sialoderivatives / Scocco P., Pedini V. // Equine Vet. J. – 2006. – Vol. 38, № 5. – P. 410-415.

Spatiotemporal expression patterns of sialoglycoconjugates during nephron morphogenesis and their regional and cell type-specific distribution in adult rat kidney / Zuber C., Paulson J. C., Toma V. [et al.] // Histochem. Cell. Biol. – 2003. – Vol. 120. – P. 143-160.

Wagner P. Occurrence and distribution of sialic acid residues in developing rat glomerulus: investigation with the Limax flavus and wheat germ agglutinin / Wagner P., Roth J. // Eur. J. Cell Biol. – 1988. – Vol. 47. – P. 259-269.

Ziak M. Expression of oligo/polyα2,8-linked deaminoneuraminic acid and megalin during kidney



development and maturation: mutually exclusive distribution with poly $\alpha$ 2,8-linked N-acetylneuraminic acid of N-CAM / Ziak M., Roth J.

// Histochem. Cell Biol. – 1999. – Vol. 112. – P. 169-178.

**Амбарова Н.О. Перестройка сиалогликанов почки крысы в постнатальном морфогенезе и при стрептозототин-индуцированной диабетической нефропатии.**

**Резюме.** С использованием 9 лектинов разной углеводной специфичности (SNA, WGA, RCA, PNA, VAA, CABA-2, SJA, SBA, HPA) проведено гистохимическое исследование сиалогликанов почки крысы в динамике постнатального морфогенеза и в процессе развития экспериментальной стрептозототин-индуцированной диабетической нефропатии. Материал фиксировали в 4% нейтральном формалине и заливали в парафин. Углеводные детерминанты гликополимеров выявляли конъюгатами лектинов с пероксидазой хрена и последующей визуализацией диаминобензидином. Постнатальный морфогенез почки сопровождался накоплением сиалогликанов в сочетании с редукцией концевых остатков DGal и DGalNAc, возрастанием гетерогенности ее отдельных структурных компонентов. На 60-ые постнатальные сутки выявлено повышенную экспрессию почечными тельцами, щеточной каймой почечных трубочек внешнего мозгового вещества рецепторов лектинов WGA и RCA, клетками кортикальных почечных трубочек – рецепторов SBA и HPA, что свидетельствовало о приобретении органом дефинитивных признаков. Развитие диабетической нефропатии сопровождалось тенденцией к накоплению гликополимеров с концевыми остатками DGal и DGalNAc в сочетании с редукцией сиалогликанов, повышенным контурированием щеточной каймы почечных трубочек соответствующими гистоспецифическими лектинами. **Ключевые слова:** лектиновая гистохимия, почка крысы, постнатальный морфогенез, диабетическая нефропатия.