

**Т.А.Бойко
Е.Ю.Шаповалова**

Крымский государственный
медицинский университет
им. С.И.Георгиевского

Ключевые слова: мезо-
нефрос, метанефрос, колла-
геновые волокна, эмбрионы
человека.

*Надійшла: 17.08.2009
Прийнята: 27.09.2009*

УДК 611.611: 611-018+611-013. 7/8

НОВЫЙ ПОДХОД К ИДЕНТИФИКАЦИИ КОЛЛАГЕНОВ I И III ТИПОВ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ ВОЛОКНИСТОГО КАРКАСА ПЕРВИЧНОЙ И ОКОНЧАТЕЛЬНОЙ ПОЧЕК У ЭМБРИОНОВ ЧЕЛОВЕКА

*Исследование выполнено в рамках научно-исследовательской работы «Законо-
мерности пренатального и постнатального гисто- и органогенеза при типич-
еской и атипической имплантации» (№ государственной регистрации
0104U009463).*

Резюме. Становление коллагенового состава волокнистого каркаса мезо- и мета-
нефроса изучено при помощи метода иммуногистохимии и лектиногистохимии у
124 зародышей человека в возрасте от 21 суток до 12 недель внутриутробного
развития, которые были фиксированы формалином и залиты в парафин. Первич-
ными антителами были моноклональные антитела к коллагену I и III типов. Ис-
пользовали лектины окуня и омелы белой. Выявлено, что коллагеновые волокна
первого типа окрашиваются лектином окуня, а коллагеновые волокна третьего
типа – лектином омелы белой. В эмбриональной соединительной ткани мезонеф-
роса до 12-ой недели присутствуют коллагеновые волокна I и III типов. В строме
метанефроса до 12-ти недель эмбриогенеза присутствуют коллагеновые волокна I
и III типов. Первыми в мезо- и метанефросе появляются коллагеновые волокна III
типа. Коллагеновые волокна I типа выявляются позднее. Коллагеновые волокна I
типа повторяют динамику и гистотопографию коллагеновых волокон III типа, но
их значительно меньше.

Морфологія. – 2009. – Т. III, № 3. – С. 42-45.
© Т.А.Бойко, Е.Ю.Шаповалова, 2009

Boyko T.A., Shapovalova Ye.Yu. New method of identification of I and III collagen types at forming fibril framework of mesonephros and metanephros of human embryos.

Summary. Becoming of collagen composition of fibril framework of meso- and metanephros was studied by the method of immunohistochemistry and lectinohistochemistry on 124 human embryos in age from 21 days to 12 weeks of intrauterine development. Embryos were fixed in formalin and embedded in the paraffin. Primary antibodies were monoclonal antibodies to the collagen type I and III. Lectins of *Perca fluviatilis* and *Vicia Alba* were used. It is received, that collagen fibers type I were stained by lectin of *Perca fluviatilis* and collagen fibers type III were stained by lectin of *Vicia Alba*. In 12 weeks embryo mesonephros connective tissue fibers consisted of types I and III collagen. In 12 weeks aged embryo metanephros stroma connective tissue fibers consisted of types I and III collagen. Collagen fibers of III type firstly appeared in meso- and metanephros. Type I collagen fibers are found later. The collagen fibers type I repeated a dynamics and histotopography of collagen fibers type III, but them far fewer.

Key words: mesonephros, metanephros, collagen fibers, human embryos.

Введение

По современным представлениям, экстрацеллюлярный матрикс – это крупномолекулярный комплекс, образующий внеклеточное окружение и активно влияющий на дифференцировку клеток, их пролиферацию, адгезию и пространственную организацию тканей (Милованов А.П., Савельева С.В., 2006). Он играет ключевую роль в эмбриогенезе, формируя ячеистую структуру для зачатков органов, что обеспечивает целенаправленную миграцию клеток – важнейшее ус-

ловие эмбрионального развития (Галкина Ю.М., 1999). Экстрацеллюлярный матрикс включает в свой состав и разнообразные типы коллагенов. Коллагены I и III типов относятся к интерстициальным коллагенам. Изучению соединительной ткани окончательной почки посвящено довольно большое число работ (Awqatl Q., Goldberg M.R., 1998; Янин В.Л. соавт., 1999), однако результаты проведенных исследований далеки от полноты, некоторые данные противоречивы, причем большинство исследований проведено на лабо-

раторных животных (Alexander B.T., 2006; Borovecki F. et al., 2006). Крайне скудны сведения о развитии волокнистого каркаса первичной почки, и они получены в основном в нашей лаборатории (Шаповалова Е.Ю. и соавт., 2008). Появление современного метода иммуногистохимии позволяет с помощью моноклональных антител конкретизировать тип коллагена и сроки его появления в развивающихся почках в процессе замены мезонефроса окончательной почкой, о чем отсутствуют сведения в доступной литературе. Лектиногистохимический метод для выявления типов коллагенов в развивающихся почках не применялся, однако имеются сведения, что фибриллогенез в плаценте был изучен с помощью лектинов, так как коллагеновые волокна I и III типа являются их рецепторами (Куш О.Г., 2006).

Целью работы явилось изучение сроков появления и локализации коллагеновых волокон, содержащих коллаген I и III типов, в составе волокнистой стромы первичной и окончательной почки в процессе их развития, расцвета и регрессии у зародышей человека, развивавшихся в матке при отсутствии явно выраженных повреждающих факторов внешней и внутренней среды.

Материалы и методы

Изучены 124 зародыша человека в возрасте от 21 суток до 12 недель внутриутробного развития на стадиях, последовательно: от раннего периода нервного желобка до начала дефинитивно-плодного периода. Обзорные препараты окрашивали гематоксилином и эозином.

Иммуногистохимическое исследование проводили на серийных парафиновых срезах толщиной 5 мкм, помещенных на адгезивные стекла, покрытые полилизинном ("Menzel-Glaser", Германия). Для освобождения антигенов после фиксации формалином использовали тепловую демаскировку антигенов в микроволновой печи "Samsung" при мощности 800 Вт в течение 10 минут в цитратном буфере при pH 6,0 (Коржевский Д.Э., Юмкина Е.А., 2005).

Для изучения коллагена I и III типа первичными антителами были моноклональные антитела к коллагену первого типа (Isotype Ig G₁, Chemicon International) и коллагену третьего типа (Isotype Ig G₁, Chemicon International). В качестве растворителя антител использовали раствор Antibody Diluent (Dako Cytomation). Дальнейшую обработку проводили с помощью системы визуализации En vision (DAKO) в течение 10 минут с каждым реактивом с биотинилированными антителами и стрептавидин-пероксидазным комплексом. Затем проводили реакцию с хромогеном DAB (Dako Cytomation), оценивая качество взаимодействия под контролем микроскопа на протяжении от 20 секунд до 3 минут. Для адекватного представления структуры ткани срезы дополнительно окрашивались гематоксилином

Майера в течение 3 минут. Дегидратация и заключение в бальзам осуществлялись в соответствии с распространенными подходами. Результат расценивали как позитивный при выпадении солей хромогена на коллагеновых волокнах мезо- и метанефроса. С целью контроля метода была проведена серия исследований с использованием позитивных и негативных образцов, которые служили эталонами. Волокна позитивные по отношению экспрессии маркеров изучали как минимум на 5-ти срезах. В каждом из них определяли количество окрашенных в коричневый цвет коллагеновых волокон в 10 полях зрения на площади 502,08 мкм² (увел. ×400 микроскопа «Olympus CX-41») с помощью окулярной сетки по Г.Г.Автандилову (1991).

Препараты также обрабатывали с применением стандартных наборов НПК «Лектинотест» г. Львов в разведении лектина 1:50 по рекомендуемой методике (Луцик А.Д. и соавт., 1989). Визуализацию мест связывания лектина проводили в системе диаминобензидин-перекись водорода. Контроль специфичности реакции осуществляли путем исключения из схемы обработки препаратов диаминобензидина. Лектин окуня (PFA), специфичен к концевым нередуцирующим остаткам альфа-L-фукозы, лектин омелы белой (VAA) – к N-ацетил-D-галактозамину. Специфичность лектина к терминальным нередуцирующим моносахаридным остаткам гликоконъюгатов дана в соответствии с данными В.О.Антонюк (2005). Интенсивность окрашивания срезов лектином оценивалась в баллах двумя исследователями независимо друг от друга. Баллы 0, 1, 2, 3, 4 – соответственно, отсутствие, слабая, умеренная, сильная и очень сильная реакции.

Результаты и их обсуждение

У зародышей в возрасте 37-41 суток (9-12 мм длины) первичные почки достигают наивысшего развития, простираясь от первого грудного до первого поясничного сегмента. Дифференцированный мезонефрос состоит из нефронов, располагающихся один над другим по вертикали. Капсула телец мезонефронов переходит в S-образно изогнутые каналцы, впадающие в Вольфов проток. Наиболее развиты мезонефроны в краниальном отделе органа. Здесь в строме наряду с небольшим количеством коллагеновых волокон первого типа встречаются в большем количестве коллагеновые волокна третьего типа. Их соотношение составляет 2,6:6,1. В средних и особенно в каудальных отделах коллагеновые волокна отсутствуют. После лектиногистохимической окраски лектинами окуня и омелы белой бензидиновая метка прослеживается на тех же волокнах, которые составляют строму мезонефроса.

У зародышей в возрасте 49-50 суток (20-21 мм длины) активно развиваются окончательные

почки, которые располагаются на уровне первого-третьего поясничных позвонков, соприкасаясь с вентральной стороны с мезонефросами и надпочечниками. Окружающая эмбриональная соединительная ткань, образует вокруг неё зачаток капсулы. На данном сроке пренатального онтогенеза впервые происходит преобразование S-образных зачатков нефронов первой генерации в почечные тельца. Однако окончательная дифференцировка почечных телец не происходит. В капсуле появляются многочисленные толстые коллагеновые волокна третьего типа. Аналогичные волокна имеются в волокнистой строме вокруг почечных лоханок, больших чашечек и S-образных зачатков нефронов первой генерации. Эти волокна имеют сродство к лектину омелы белой.

К 55-60 суткам эмбриогенеза (зародыши 25-30 мм длины) краниальные отделы мезонефроса полностью разрушились, а в средних отделах появились признаки дегенерации, проявляющиеся, в том числе, и снижением биосинтеза коллагеновых волокон первого и третьего типов. Их соотношение 1,9:4,8. В наиболее каудальной части первичной почки мезонефроны находятся в стадии расцвета. Волокнистая строма этих отделов преимущественно состоит из коллагеновых волокон третьего типа, окрашивающихся как моноклональными антителами к коллагену третьего типа, так и лектином омелы белой, и небольшого количества коллагеновых волокон первого типа, окрашивающихся лектином окуня. Их соотношение 1,4:4,2. Волокна образуют нежную сеточку вокруг почечных телец и канальцев мезонефронефров.

На этом сроке развития в метанефросе впервые обнаруживаются структурно сформированные почечные тельца округлой формы, имеющие сосудистый полюс, в области которого находится ножка клубочка капилляров. Петли гломерулярных капилляров развиты недостаточно и расположены по его периферии. В капсуле помимо коллагеновых волокон третьего типа появились коллагеновые волокна первого типа. Такие же волокна имеются вокруг почечных лоханок, больших чашечек и почечных телец и канальцев нефронов первой генерации.

На 10-й неделе развития (зародыши 33-45 мм длины) в метанефросе явно видны нефроны трех генераций. Наиболее хорошо развиты нефроны первой генерации. Волокнистый компонент капсулы и стромы состоит из коллагеновых волокон первого и третьего типа (рис. 1, 2), причем коллагеновые волокна третьего типа, окрашенные лектином омелы белой, более толстые и преобладают количественно, особенно в капсуле и вокруг эпителиальной закладки больших чашечек и лоханок.

К концу 12-й недели эмбриогенеза (зародыши 57-70 мм длины), в оставшейся функциони-

рующей наиболее каудальной части мезонефроса, волокнистый каркас эмбриональной соединительной ткани состоит из коллагеновых волокон первого и третьего типов. Их соотношение равно 2,8:6,4. Коллагеновые волокна третьего типа более толстые и многочисленные.

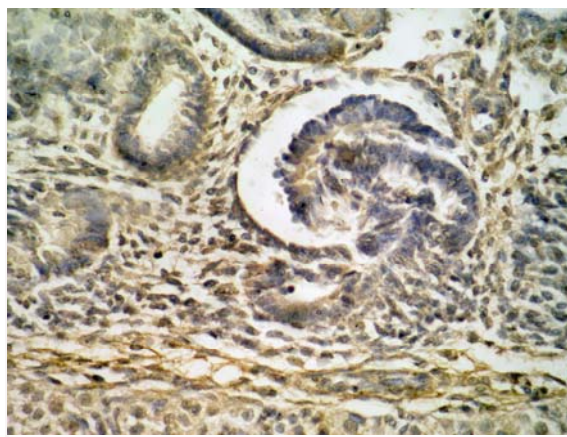


Рис. 1. Срез окончательной почки зародыша 10 недель, 45 мм длины. Окраска иммуногистохимическим методом. Дополнительное окрашивание гематоксилином Майера. Позитивная реакция на коллаген третьего типа.

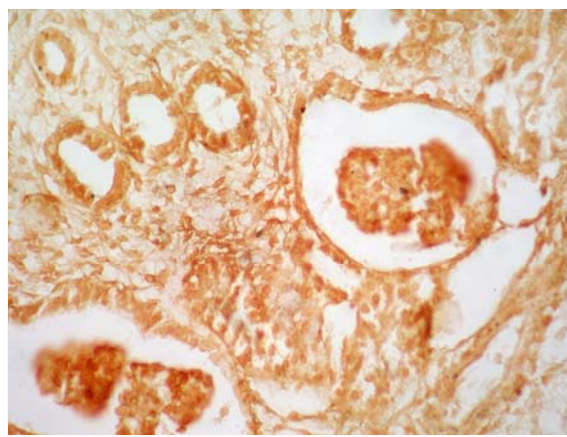


Рис. 2. Срез окончательной почки зародыша 10 недель, 45 мм длины. Обработка конъюгатом лектина омелы белой с пероксидазой хрена. Проявление в системе диаминобензидин – перекись водорода. $\times 15$. Позитивная реакция на коллаген третьего типа.

В окончательной почке сформировались нефроны четырех генераций. В эмбриональной соединительной ткани присутствуют коллагеновые волокна первого и третьего типов. Наиболее грубые и многочисленные – коллагеновые волокна третьего типа. Самые нежные и редкие – коллагеновые волокна второго типа, которые окрашиваются лектином окуня. В капсуле органа и строме вокруг почечных лоханок и больших чашечек всех видов волокон значительно больше.

Выводы

1. Коллагеновые волокна первого типа, в развивающихся мезо- и метанефросе, окрашиваются лектином окуня, а коллагеновые волокна третьего типа – лектином омелы белой.

2. В эмбриональной соединительной ткани первичной почки человека к 12-ти неделям эмбриогенеза присутствуют коллагеновые волокна I и III типов.

3. В строме окончательной почки человека к 12-ти неделям эмбриогенеза присутствуют кол-

лагеновые волокна I и III типов.

4. Первыми в мезо- и метанефросе появляются коллагеновые волокна III типа. Коллагеновые волокна I типа обнаруживаются позднее. Коллагеновые волокна I типа повторяют динамику и гистотопографию коллагеновых волокон III типа, но их значительно меньше.

Перспективы дальнейших исследований связаны с изучением морфологических особенностей стромы первичной и окончательной почки в процессе развития.

Литературные источники

Автандилов Г. Г. Медицинская морфометрия / Г. Г. Автандилов. – М. : Медицина, 1991. – 380 с.

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

Галкина Ю. М. Развитие и строение органов человека и млекопитающих животных в онтогенезе / Ю. М. Галкина // Российские морфологические ведомости. – 1999. – № 1-2. – 49 с.

Коржевский Д. Э. Применение методов теплового демаскирования антигенов на парафиновых срезах головного мозга крысы / Д. Э. Коржевский, Е. А. Юмкина // Морфология. – 2005. – Т. 127, № 2. – С. 76-77.

Куц О. Г. Особливості синтезу колагенів I, III, V і VI типів в плаценті при фізіологічно перебігаючій вагітності та при пізніх гестозах / О. Г. Куц // Здобутки клінічної і експериментальної медицини. – 2006. - № 2. – С. 148-151.

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

Милованов А. П. Внутриутробное развитие человека / А. П. Милованов, С. В. Савельева. – Москва, 2006. – 382 с.

Шаповалова Е. Ю. Особенности биосинтеза

полисахаридов и волокнистого каркаса поджелудочной железой и окончательной почкой в раннем эмбриогенезе у человека при маточной имплантации / Е. Ю. Шаповалова, Т. А. Бойко, Н. И. Майструк // Таврический медико-биологический вестник. – 2008. – Т. 11, № 2. – С. 182-186.

Янин В. Л. Морфометрия тканевых и органических структур почки в раннем эмбриогенезе / В. Л. Янин, Л. В. Вихарева, С. М. Пантелеев // Российские морфологические ведомости. – 1999. – № 1-2. – С. 174.

Alexander B. T. Fetal programming of hypertension / B. T. Alexander // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. – 2006. – Vol. 290, № 1. – P. 1-10.

Awqatl Q. Architectural patterns in branching morphogenesis in the kidney / Q. Awqatl, M. R. Goldberg // Kidney Int. – 1998. – Vol. 54, № 6. – P. 1832-1842.

Borovecki F. Bone morphogenetic protein-7 from serum of pregnant mice is available to the fetus through placental transfer during early stages of development / F. Borovecki, M. Jelic, L. Grgurevic // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2004. – Vol. 2, № 316. – P. 490-500.

Бойко Т.А., Шаповалова О.Ю. Новий підхід до ідентифікації колагенів I та III типів при формуванні волокнистого каркаса первинної та остаточної нирок у ембріонів людини.

Резюме. Становлення колагенового складу волокнистого каркасу мезо- і метанефросу вивчене за допомогою методу імуногістохімії та лектиногістохімії у 124 зародків людини у віці від 21 доби до 12 тижнів внутрішньоутробного розвитку, які були фіксовані формаліном і залиті в парафін. Первинними антитілами були моноклональні антитіла до колагену I та III типів. Використовувались лектини окуня та омели білої. Виявлено, що колагенові волокна першого типу забарвлювалися лектином окуня, а колагенові волокна третього типу – лектином омели білої. В ембріональній сполучній тканині мезонефросу до 12-ого тижня присутні колагенові волокна I та III типів. У стромі метанефросу до 12-ти тижнів ембріогенезу присутні колагенові волокна I і III типів. Першими в мезо- і метанефросі з'являються колагенові волокна III типу. Колагенові волокна I типу виявляються пізніше. Колагенові волокна I типу повторюють динаміку та гистотопографію колагенових волокон III типу, але їх значно менше.

Ключові слова: мезонефрос, метанефрос, колагенові волокна, ембріони людини.