



С.В. Чугін, М.А. Довбиш

Особливості розподілу глікозаміногліканів і рецепторів до лектину зародків пшениці у щурів перших двох місяців життя в нормі та після внутрішньоплідного введення антигену

Запорізький державний медичний університет

Ключові слова: нирка, антиген, глікозаміноглікан, лектин зародків пшениці.

Ключевые слова: почка, антиген, гликозаминогликаны, лектин зародков пшеницы.

Key words: kidney, antigen, glycoaminoglycans, wheat germ agglutinin.

Вивчення розподілу глікозаміногліканів і лектину зародків пшениці у нирках щурів перших двох місяців життя дозволило встановити етапність формування коркової речовини й дозволяє діагностувати деякі захворювання нирок.

Изучение распределения гликозаминогликанов и лектина зародков пшеницы в почках крыс первых двух месяцев жизни позволило установить этапность формирования коркового вещества и позволяет диагностировать некоторые заболевания почек.

Studying of distribution glycosaminoglycans and lectin wheat germ in kidneys of rats of first two months of a life has allowed to establish stages formations cortex substances and allows to diagnose some diseases of kidneys.

Основну кількість дослідних робіт, спрямованих на вивчення будови й розвитку нирки в ембріональному й ранньому післянатальному періоді життя, виконано в 1960–1980-х роках [1,3,4]. Однією з ознак ступеня зрілості й остаточного диференціювання є розподіл на мембранах клітин і в міжклітинному матриксі вуглеводвмісних біополімерів [2,7]. Також вміст рецепторів до лектину зародків пшениці вказує на адгезивні властивості, ступінь зрілості й диференціювання клітин [5]. Існує цілий ряд робіт, присвячених вивченню цих біохімічних утворень в нирці як у людини, так і у лабораторних тварин [6,8], однак на сьогодні не вивчено їх розподіл у нирках новонароджених тварин після внутрішньоплідної дії антигену.

Мета роботи

Встановити особливості розподілу глікозаміногліканів і рецепторів до лектину WGA у щурів перших двох місяців життя в нормі й після внутрішньоплідного введення антигену.

Матеріали і методи дослідження

Об'єкти дослідження – 330 нирок білих щурів лінії Вістар. В експерименті використовували 3 групи тварин: I – інтактні; II – щури, яким на 18-ту добу внутрішньоутробного розвитку вводили людський гамма-глобулін; III – контрольна, тваринам якої на 18-ту добу внутрішньоутробного розвитку вводили 0,9% розчин NaCl.

Тварин зважували й декапітували на 1-, 3-, 7-, 11-, 14-, 21-, 30-, 45- й 60-ту добу. Забій проводили відповідно до вимог «Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальними та іншими науковими цілями» (Страсбург, 18.03.86). Нирки щурів фіксували в рідині Буена. Шматочки зневоднювали у висхідній батареї спиртів, починаючи з 40%. Як проміжне середовище використовували хлороформ. Шматочки заливали в суміш парафіну, воску, каучуку (20:1:1). У блоці нирку орієнтували апікальним полюсом до площини мікротомного ножа; з блоку виготовляли 100–150 серійних зрізів товщиною 5–6 мкм.

Весь комплекс глікозаміногліканів виявляли за допомогою альціанового синього при pH 2,6 з критичною концентрацією хлористого магнію 0,2 М після попередньої обробки зрізів тестикюлярною гіалуронідазою або без неї. Облік результатів забарвлення гістохімічного виявлення глікозаміногліканів проводили напівкількісно: ++++ – темно-синє забарвлення; +++ – синє; ++ – голубе; + – світло-голубе; 0 – відсутність забарвлення.

Вивчали динаміку структур нирки, що мають рецептори до лектинів зародків пшениці. Обробку зрізів робили кон'югатом лектину зародків пшениці – пероксидазою хрому (WGA-HRP) з використанням стандартних наборів НБК «Лектинотест». Для проявлення використовували розчин 3,3-диметилбензидину. Облік результатів реакції з кон'югатом лектину зародків пшениці – пероксидазою хрому (WGA-HRP), проводили напівкількісно при імерсійному збільшенні мікроскопу (об. 90, ок. 7): +++ – темно-коричневе фарбування; ++ – коричневе; + – світло-коричневе; ± – бежеве; 0 – відсутність фарбування.

Результати та їх обговорення

До складу гіалуронової кислоти входить N-ацетил-D-глюкозамін, а до складу сульфатованих глікозаміногліканів входять вуглеводні залишки, що містять ацетил-D-галактозамін і D-галактозу, що є невід'ємною частиною рецепторів, які забезпечують міжклітинну й клітинно-матриксну взаємодію при формуванні будь-яких тканин та органів. При виявленні глікозаміногліканів і рецепторів до лектину зародків пшениці у паренхімі нирки встановлено, що найбільша кількість альціанофільних речовин міститься у фіброзній капсулі нирки й у цитоплазмі клітин ниркового тільця нефрону. Кількість глікозаміногліканів поступово знижується й до кінця другого місяця життя альціановий синій приблизно з однаковою інтенсивністю фарбує всі структури паренхіми нирки досліджуваних груп тварин. У антигенпремійованих тварин у недиференційованих клітинах нефрогенної зони, в епітеліоцитах каналців

Таблиця 1

Показник інтенсивності забарвлення після постановки реакції з альціановим синім, з критичною концентрацією іонів $MgCl_2 - 0,2 M$ і ферментативним контролем у нирці щурів

Доба життя	Групи тварин	Капсула нирки		Клітини нефрогенної зони		Клітини капсули тільця нефрону		Клубочок нефрону		Епітеліоцити проксимального звитого каналця		Епітеліоцити петлі Генле		Епітеліоцити дистального звитого каналця		Епітеліоцити збиральних каналців		Сполучна тканина		Ендотеліоцити судин	
		I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
1	1	++++	++	+	0	++++	+++	++++	+++	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+
	2	++++	++	++	0	++++	++	++++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++
	3	++++	++	+	0	++++	+++	++++	+++	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+
3	1	++++	++	+	0	++++	+++	++++	+++	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+
	2	++++	++	++	0	++++	+++	++++	+++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++
	3	++++	++	+	0	++++	+++	++++	+++	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+
7	1	++++	++	+	0	++++	+++	++++	+++	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+
	2	++++	++	++	0	++++	+++	++++	+++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++
	3	++++	++	+	0	++++	+++	++++	+++	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+
11	1	+++	++	+	+	++++	+++	++++	+++	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+
	2	+++	++	+	+	++++	+++	++++	+++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++
	3	+++	++	+	+	++++	+++	++++	+++	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+
14	1	+++	++	+	+	++++	+++	++++	+++	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+
	2	+++	++	+	+	++++	+++	++++	+++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++
	3	+++	++	+	+	++++	+++	++++	+++	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+
21	1	+++	++	+	+	++++	+++	++++	+++	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+
	2	+++	++	відсутня		++++	+++	++++	+++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++
	3	+++	++	+	+	++++	+++	++++	+++	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+
30	1	++	++	відсутня		+++	++	++++	+++	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+
	2	++	++	відсутня		+++	++	++++	+++	++	+	++	+	++	+	++	+	+++	++	+++	++
	3	++	++	відсутня		+++	++	++++	+++	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+
45	1	++	++	відсутня		++	++	+++	++	++	+	++	+	++	+	++	+	+++	++	+++	++
	2	++	++	відсутня		++	++	+++	++	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+
	3	++	++	відсутня		++	++	+++	++	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+
60	1	++	++	відсутня		++	++	+++	++	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+
	2	++	++	відсутня		++	++	+++	++	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+
	3	++	++	відсутня		++	++	+++	++	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+

Примітка: 1 група – інтактні тварини, 2 – експериментальні щури, 3 – контрольні; ++++ – темно-синє забарвлення; +++ – синє забарвлення; ++ – голубе забарвлення; + – світло-голубе забарвлення; 0 – відсутність забарвлення; I – альціановий синій, II – контроль з тестикулярною гіалуронідазою + альціановий синій.

нефрону і збиральних каналців, в ендотеліоцитах судин коркової і мозкової речовини й у сполучній тканині міститься більше альціанофільних речовин. Кількість глікозаміногліканів у всіх групах щурів стає однаковою в нефрогенній зоні на 11 добу життя, в епітеліоцитах каналців нефрону й ендотеліоцитах – на 45 добу життя, а в сполучній тканині – на 60-ту (табл. 1).

У тварин, що внутрішньоплідно отримували антиген, відзначається також більша кількість гіалуронової кислоти у перший тиждень життя в нефрогенній зоні й клітинах капсули ниркового тільця і довше зберігається превалювання гіалуронідазостабільних сульфатованих глікозаміногліканів у клітинних елементах нефрону, ендотеліоцитах судин і в сполучній тканині. Можливо, це пов'язано з більш раннім диференціюванням і становленням дефінітивних компонентів коркової і мозкової

речовини нирки в антигенпремійованих тварин і вказує на вищу швидкість обмінних процесів у клітинах.

Відомо, що кінцевими залишками рецепторів до лектину WGA є ацетил-D-глюкозамін і сіалова кислота. Виявлення цих вуглеводних рецепторів дозволяє вивчити функціональний стан клітин, їх адгезивні властивості, а також відображає стан клітин в інтерфазі. Капсула нирки містить максимальну кількість WGA-рецепторів у всіх групах тварин з 1-ї до 21-ї доби життя включно, а потім спостерігають зниження інтенсивності забарвлення капсули нирки з 30-ї доби життя, і вона залишається рівною в ++ в усіх групах щурів до 60 доби післянатального періоду. Нефрогенна зона не містить рецепторів до лектину зародків пшениці, окрім клітин, що руйнуються й утворюють WGA+ вміст у просвіті капсули ниркового тільця, та каналців нефрону, що формуються. Гломе-

рула нефрону забарвлюється у коричневий колір у всіх групах тварин з 1 по 14 добу життя й на 30 добу. На 21 добу інтенсивність розподілу WGA+-рецепторів зменшується у антигенпремійованих щурів, у порівнянні з контролем, а на 45 добу, навпаки, більше рецепторів виявляється в експериментальній групі тварин (табл. 2). На 60 добу ці показники вирівнюються, і гломерула нефрону стає світло-коричневого кольору в нирках усіх тварин. У антигенпремійованих новонароджених щурів кількість рецепторів до лектину зародків пшениці більша на мембрані клітин капсули нефрону й на структурах сполучної тканини (++), у порівнянні з контрольними групами щурів (+). Надалі інтенсивність забарвлення у

клітин капсули нефрону стає однаковою в усіх групах тварин до 14 доби включно. На 21 добу спостерігається зворотна тенденція: у експериментальних щурів виявляється менш інтенсивне забарвлення цих клітин, ніж у інтактних тварин, проте на 45 добу життя знову збільшується кількість WGA+-рецепторів у другій групі щурів.

Сполучна тканина містить більшу кількість рецепторів до лектину зародків пшениці у експериментальних щурів ще на 7 добу післянатального періоду, а потім відзначається превалювання інтенсивності розподілу цих рецепторів у контрольних груп тварин до 14 доби включно, а починаючи з 21 доби життя цей показник

Таблиця 2

Інтенсивність розподілу рецепторів до лектину зародків пшениці в нирці щурів (WGA)

Доба життя	Групи тварин	Капсула нирки	Нефрогенна зона	Гломерула нефрону	Капсула нефрону	Проксимальні каналці		Дистальні каналці	Петля Генле	Збиральні каналці	Сполучна тканина	Судини
						Апікальна мембрана	Внутрішньоцитоплазматичні пухирці					
1	1	+++	±	++	+	++	+	+	+	++	+	+
	2	+++	±	++	++	++	+	+	+	++	++	+
	3	+++	±	++	+	++	+	+	+	++	+	+
3	1	+++	±	++	++	++	+	+	+	+	++	+
	2	+++	±	++	++	++	+	+	+	+	++	+
	3	+++	±	++	+	++	+	+	+	+	++	++
7	1	+++	±	++	++	++	++	+	+	+	+	++
	2	+++	±	++	++	++	++	+	+	+	++	++
	3	+++	±	++	++	++	++	+	+	+	+	++
11	1	+++	±	++	++	++	++	+	+	+	++	++
	2	+++	±	++	++	++	++	+	+	+	+	+
	3	+++	±	++	++	++	++	+	+	+	++	++
14	1	+++	±	++	+	++	++	+	+	+	++	++
	2	+++	±	++	+	++	++	+	+	+	+	+
	3	+++	±	++	+	++	++	+	+	+	++	++
21	1	+++	±	++	++	++	+	+	++	++	+	++
	2	+++	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3	+++	±	++	++	++	+	+	++	++	+	++
30	1	++	-	++	++	+	+	+	+	+	+	+
	2	++	-	++	++	+	+	+	+	+	+	+
	3	++	-	++	++	+	+	+	+	+	+	+
45	1	++	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	++	-	++	++	+	+	+	+	+	+	+
	3	++	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
60	1	++	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	++	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3	++	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Примітка: 1 група – інтактні тварини, 2 – експериментальні щури, 3 – контрольна; +++ – темно-коричневе фарбування; ++ – коричневе; +- світло-коричневе; ± – бежеве фарбування; 0 – відсутність фарбування.

стає однаковим у нирках усіх тварин і складає (+). Апікальна мембрана проксимальних звитих каналців забарвлюється в коричневий колір у всіх тварин до 14 доби включно, а на 21 добу життя у антигенпремійованих щурів відзначається зниження забарвлення до світло-коричневого, яким воно стає й у інтактних щурів починаючи з 30 доби життя. Внутрішньоцитоплазматичні пухирці максимально забарвлюються бензидиновою міткою, виявляючи WGA⁺-рецептори з 7 до 14 доби життя в усіх групах лабораторних тварин. Ендотеліоцити судин містять меншу кількість рецепторів до лектину зародків пшениці в експериментальних тварин на 7, 11 і 14 добу післянатального періоду. На 60-у добу життя інтенсивність розподілу WGA⁺-рецепторів стає приблизно однаковою в усіх групах щурів і складає +, а в капсулі нирки – ++.

Отже, під впливом внутрішньоплідного введення антигену, в нирках на фоні підвищеної кількості імунологічно незрілих лімфоцитів прискорюються етапи становлення та функціональна активність клітин, що входять до складу нефрону. У зв'язку з цим змінюється картина вмісту вуглеводних залишків глікокаліксу клітинних мембран і вуглеводів міжклітинного матриксу.

За даними ряду авторів [5], у нирці дорослих щурів і людини рецептори до лектину зародків пшениці постійно виявляються в нирковій капсулі й клубочках. Також відомо, що в перші 2–3 місяці життя в щурів і перший рік життя людини епітелій проксимальних звитих каналців виконує аліментарну функцію, як і епітеліоцити тонкої кишки [4]. З цих позицій можна припустити, що наяв-

ність WGA⁺-рецепторів на мембранах пухирців у цитоплазмі клітин виконує протекторну функцію, що захищає клітини від аутолізу гідролітичними ферментами. До 21-ї доби рівень експресії рецепторів до WGA зменшується, що відображає зміни функціональної активності клітин. З іншого боку, за допомогою лектину зародків пшениці виявляється анексин V, що входить до складу піноцитозних пухирців, що може відображати рівень резорбційної активності епітеліоцитів проксимальних звитих каналців.

Висновки

Використання лектину зародків пшениці дозволило чітко диференціювати процес становлення кори й зникнення нефрогенної зони у тварин, яким внутрішньоплідно вводили антиген раніше, ніж у інтактних. Формування клубочка відбувається шляхом зміни форми клітин, їх сплюснення, злуцвання й руйнування. Клітини, що злуцуються, містять у цитоплазмі велику кількість WGA⁺-речовин, за якими можна простежити формування клубочка. На 1-шу добу життя клітини капсули ниркового тільця у тварин, що внутрішньоплідно отримували антиген, забарвлюються більш інтенсивно, ніж у тварин інтактної і контрольної груп.

На фоні порушення лімфатичного відтоку від нирок на фоні гострих запальних або хронічних деструктивних процесів відбувається підвищення кількості рецепторів [5,8] до лектину зародків пшениці у клітинах морфофункціональних одиниць органу й у міжклітинному матриксі, що можна використовувати при взятті біопсії з діагностичною метою.

Література

1. Айзман Р.И. Морфофункциональное развитие почек и водно-солевого обмена в онтогенезе человека / Р.И. Айзман // Онтогенез почки: Сб. научных трудов / Под. ред. Великанова Л.К. – Новосибирск, 1984. С. 73–97.
2. Амбарова Н.О. Фукозогликиани нирки шкура: перерозподіл у динаміці постнатального онтогенезу та в процесі розвитку стрептоцотин-індукованого цукрового діабету / Н.О. Амбарова, В.О. Антонюк, О.Д. Луцик // Клінічна анатомія та оперативна хірургія. – 2009. – Т. 8, №1. – С. 15–21.
3. Варшавский Б.Я. Почечный секреторный транспорт в раннем постнатальном периоде / Б.Я. Варшавский // IV Всесоюзная конференция по водно-солевому обмену и функции почек. Мат. научных сообщений / Под ред. Ю.И. Иванова. – Черновцы, 1974. – С. 10–11.
4. Zufarov K.A. Структурно-функциональная характеристика почек в постнатальном онтогенезе / К.А. Zufarov, В.М. Гонтмахер // Онтогенез почки: Сб. научных трудов / Под. ред. д. биол. н. Великанова Л.К. – Новосибирск, 1984. – С. 14–24.
5. Волошин Н.А. Использование методов лектиновой гистохимии в морфологии / Н.А. Волошин, Е.А. Григорьева, М.А. Довбыш // Таврический медико-биологический вестник. – 2004. – Т. 7, №4. – С. 40–41.
6. Папаян А.В. Неонатальная нефрология / А.В. Папаян, И.С. Стяжкина. – СПб.: Питер, 2002. – 448 с.
7. Goncharevskaya A.O. The development of various generations of nephrons during postnatal ontogenesis in the rat / A.O. Goncharevskaya, H. Dlouha // Anat. Rec. – 1975. – V. 182. – P. 367–376.
8. Ichimura K. Glomerular endothelial cells form diaphragms during development and pathologic conditions / K. Ichimura, R.V. Stan, H. Kurihara, T. Sakai // J Am Soc Nephrol. – 2008. – V. 19. – P. 1463–1471.

Відомості про авторів:

Чугін С.В., асистент каф. анатомії людини, оперативної хірургії і топографічної анатомії ЗДМУ.

Довбиш М.А., д. мед. н., професор каф. урології, променевої діагностики і терапії ЗДМУ.

Адреса для листування:

Чугін Сергій В'ячеславович, м. Запоріжжя, пр-т Металургів, б. 8, кв. 16.

E-mail: chugins@mail.ru