

© Амбарова Н.О., Антонюк В.О., Луцик О.Д.

УДК 611.611-019:616.379-008.64-092]-018:547.96

## ФУКОЗОГЛІКАНИ НИРКИ ЩУРА: ПЕРЕРОЗПОДІЛ У ДИНАМІЦІ ПОСТНАТАЛЬНОГО ОНТОГЕНЕЗУ ТА В ПРОЦЕСІ РОЗВИТКУ СТРЕПТОЗОТОЦИН-ІНДУКОВАНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ

*Н.О.Амбарова, В.О.Антонюк, О.Д.Луцик*

*Кафедра гістології, цитології та ембріології (зав. – проф. О.Д.Луцик) Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького*

**Резюме.** З використанням п'яти фукозоспецифічних лектинів (TPA, LLA, PFA, LABA та LASA) досліджено перерозподіл глікокон'югатів нирки щура в динаміці постнатального онтогенезу (1-ша, 20-та, 60-та, 120-та доба) та на 14-ту, 30-ту, 60-ту, 80-ту доби розвитку стрептозотоцин-індукованої діабетичної нефропатії. Постнатальний онтогенез супроводжувався накопиченням та генералізацією рецепторів усіх названих лектинів у складі цитоплазматичних та ядерних глікополімерів нефроцитів, клітин ниркових тілець; найбільш інтенсивний перерозподіл глікокон'югатів задокументовано у проміжку між 1-ю та 20-ю добами. Розвиток діабетичної нефропатії виражався редукцією фукозогліканів у складі паренхіматозних елементів нирки з одночасним контуруванням люменальної поверхні проксимальних та дистальних трубочок, збірних ниркових проток.

**Ключові слова:** лектинова гістохімія, діабетична нефропатія, онтогенез.

Цукровий діабет (ЦД) належить до числа найактуальніших проблем сучасної медицини. Особливе занепокоєння викликає стійка тенденція до наростання захворюваності на ЦД у розвинених країнах світу. В Україні, за даними офіційної статистики [1], захворюваність на ЦД у 2004 році становила 19,5 випадків на 10 тис. населення, а загальна кількість хворих перевищувала 900 тис. осіб. До числа найпоширеніших ускладнень і причин смертності при ЦД належить діабетична нефропатія (ДН). Незважаючи на незаперечні успіхи сучасної теоретичної та клінічної діабетології, тонкі молекулярні механізми розвитку ДН залишаються нез'ясованими [2, 3].

В арсеналі інструментів дослідження тканинних глікополімерів і глікому клітин тривалий час з успіхом застосовуються лектини [4-6]. Разом з тим, аналіз літератури [7-9] свідчить, що дані стосовно пере-

розподілу фукозогліканів у нирці при розвитку ДН відсутні.

**Мета дослідження.** Вивчити в експерименті гістотопографію та перерозподіл рецепторів фукозоспецифічних лектинів у структурних компонентах нирки у процесі розвитку стрептозотоцин-індукованої ДН і порівняти характер цих змін з перерозподілом фукозогліканів упродовж постнатального морфогенезу нирки.

**Матеріал і методи.** Для вивчення характеру перерозподілу фукозогліканів використані нирки 9 груп щурів лінії Вістар (по 3 особини у кожній групі, разом 27 тварин): на 1-шу, 20-ту, 60-ту, 120-ту доби після народження, на 14-ту, 30-ту, 60-ту і 80-ту доби після внутрішньоочеревинного введення стрептозотоцину (Sigma, США) з розрахунку 70 мг/кг. Розвиток ЦД контролювали за рівнем глюкози, яку визначали глюкооксидазним методом з використанням

реактивів фірми LaChema (Чехія) відповідно до інструкції виробника. Свідченням розвитку ЦД був рівень глюкози в крові у межах 10-18 мМоль/л. Утримання тварин та маніпуляції з ними проводилися відповідно до положень "Загальних етичних принципів експериментів на тваринах", ухвалених I Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Щурів окремих вікових груп або етапів розвитку стрептозотоцинового ЦД 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 завтовшки 5-7 мкм фарбували гематоксиліном і еозином.

Вуглеводні детермінанти досліджували за допомогою п'яти фукозоспецифічних лектинів: 1) тетрагонолобуса пурпурового (*Tetragonolobus purpureus agglutinin*, TPA, син. *Lotus tetragonolobus agglutinin*, LTA); 2) судака звичайного (*Lucioperca lucioperca agglutinin*, LLA); 3) окуня звичайного (*Perca fluviatilis agglutinin*, PFA); 4) кори золотого дощу (*Laburnum anagyroides bark agglutinin*, LABA); 5) насіння золотого дощу (*Laburnum anagyroides seed agglutinin*, LASA). Названі лектини взаємодіють з кінцевими залишками  $\alpha$ L-фукози ( $\alpha$ LFuc), відрізняючись за афінністю. Лектин LASA на рівні моносахаридів виявляє спорідненість до D-галактози (DGal), але для сильної взаємодії цього лектину з вуглеводними рецепторами абсолютно необхідними є залишки  $\alpha$ LFuc [4].

Лектини були очищені та кон'юговані з пероксидазою хрому в лабораторії "Лектинотест" доктором фармацевтичних наук В.Антонюком. Візуалізацію місць зв'язування лектинів досягали з використанням (як хромогена) діамінобензидину тетрагідрохлориду (Sigma, США) в присутності перекису водню [6]. Мікроскопію і фотографування препаратів проводили на мікроскопі МБІ-15-2.

**Результати дослідження та їх обговорення.** При зафарбовуванні гематоксиліном і еозином нирки новонародженого щура в глибині її кіркової речовини та на межі останньої з поверхневою зоною мозкової речовини виявлено морфологічно сформовані ниркові тільця. У складі субкапсулярної кіркової речовини ідентифіковано ділянки метанефрогенної мезенхіми, кінцеві ампули та S-подібні тільця збірних ниркових проток, що служать віддзеркаленням процесів формотворення нових нефронів у напрямі від мозкової речовини до поверхні нирки (О.А.Гончаревская, 1977). На 20-ту постнатальну добу кінцеві ампули, S-подібні тільця та метанефрогенні острівці більше не виявлялися; у групах тварин 60-ї та 120-ї доби постнатального онтогенезу спостерігалось видовження ниркових трубочок і набуття окремими популяціями нефроцитів морфологічних ознак, характерних для того чи іншого сегмента нефрону дорослої тварини, що узгоджується з відомими даними [9].

На 14-ту добу після введення стрептозоточину на оглядових препаратах структура нирки практично не змінилася. На 30-ту добу на тлі загальної гіпертрофії та набряків нефроцитів, розширення сечових просторів капсул нефронів виявлені ділянки деструкції окремих нефронів. На 60-ту і 80-ту добу розвитку ДН набряк паренхіми нирки, окремі ділянки геморагій поєднувалися з гіаліново-крапельною дистрофією мезангіоцитів ниркових тілець, нефроцитів ниркових трубочок, атрофією та стоншенням збірних проток мозкової речовини. Виявлені гістопатологічні зміни загалом вписуються у концепцію морфологічних маніфестацій розвитку ДН [3].

**Лектин TPA.** У нирці новонароджених щурів даний лектин маркував перинуклеарні ділянки цитоплазми нефроцитів проксимальних і дистальних трубочок у глибині кіркової речовини, люменальну поверхню збірних ниркових проток, залишаючи ареаактивними ядра нефроцитів та ділянки

поверхневої метанефрогенної мезенхіми (рис. 1-А). На 20-й день постнатального онтогенезу і пізніше спостерігали поступове наростання та генералізацію реактивності нефроцитів у складі всієї паренхіми нирки (рис. 1-Б). Від 20-ї доби нами ідентифікована експресія рецепторів лектину ТРА у складі ядер нефроцитів, подоцитів, мезангіоцитів та ендотеліоцитів, що було виражено особливо чітко у нирках щурів 120-ї постнатальної доби (рис. 1-В). Розвиток ДН супроводжувався поступовим зниженням реактивності паренхіми нирки, на тлі якої відносно інтенсивним зафарбовуванням вирізнялися лише клітини збірних ниркових проток (рис. 1-Г), що ставало помітним вже з 14-ї доби після ін'єкції стрептозотоцину.

*Лектин LLA.* У нирці новонароджених щурів з даним лектином взаємодіяли глікополімери люменальної поверхні кінцевих ампул, S-подібних тілець та основних частин збірних ниркових проток на фоні ареактивності метанефрогенної мезенхіми та основної маси нефроцитів. Постнатальні зміни характеризувалися кількісним наростанням і генералізацією гістотопографії LLA-реактивних фукозогліканів у цитоплазмі нефроцитів. На 120-ту добу онтогенезу виявлено контурування люменальної поверхні ниркових трубочок з одночасним посиленням реактивності цитоплазматичних глікокон'югатів нефроцитів мозкової речовини нирки. Розвиток ДН з 14-ї доби і пізніше після ін'єкції стрептозотоцину виражався поступовою редукцією зафарбовування нефроцитів з одночасним посиленням контурування люменальної поверхні збірних ниркових проток.

*Лектин PFA.* На 1-шу добу постнатального онтогенезу ідентифіковано зв'язування даного лектину з глікокон'югатами апікальних зон клітин кінцевих ампул, S-подібних тілець та основних сегментів збірних ниркових проток. Від 20-ї до 120-ї доби онтогенезу рецептори лектину PFA поступово акумулювалися у складі ядер нефроцитів, по-

доцитів, мезангіоцитів, а також у цитоплазмі клітин збірних ниркових проток. Введення стрептозотоцину індукувало редукцію зафарбовування нефроцитів з одночасним посиленням на цьому тлі контурування люменальної поверхні збірних ниркових проток.

*Лектин LABA.* На 1-шу добу онтогенезу реактивність концентрувалася на люменальній поверхні кінцевих ампул, у перинуклеарній зоні нефроцитів проксимальних і дистальних трубочок, збірних ниркових проток на тлі ареактивних ниркових клубочків та острівців метанефрогенної мезенхіми. На 20-ту, 60-ту і 120-ту доби онтогенезу зростала реактивність цитоплазматичних глікокон'югатів проксимальних і дистальних трубочок, рецептори лектину LABA з'являлися у складі ядер подоцитів, мезангіоцитів, клітин ниркових трубочок. Розвиток цукрового діабету супроводжувався зниженням реактивності ядерних і цитоплазматичних глікокон'югатів нефроцитів від 14-ї доби після ін'єкції стрептозотоцину, посиленням контурування люменальної поверхні проксимальних і дистальних трубочок, збірних ниркових проток, що особливо помітно в глибокій зоні мозкової речовини.

*Лектин LASA.* На 1-шу добу онтогенезу інтенсивну реактивність з означеним лектином виявляли цитоплазматичні глікополімери клітин проксимальних і дистальних трубочок на тлі ареактивної метанефрогенної мезенхіми, ниркових клубочків та ядер нефроцитів (рис. 2-А). На 20-ту, 60-ту і 120-ту доби задокументовано генералізацію зафарбовування елементів ниркової паренхіми, появу реактивності ядерних структур (рис. 2-Б). На 14-ту і 30-ту доби після введення стрептозотоцину спостерігалася часткова редукція лектинової реактивності. На 60-ту і 80-ту доби розвитку стрептозотин-індукованої ДН редукція реактивності поєднувалася з розширенням сечових просторів капсул нефронів, появою у паренхімі нирки окремих деструктивно змінених зон (рис. 2-В), атрофією і стоншенням збірних

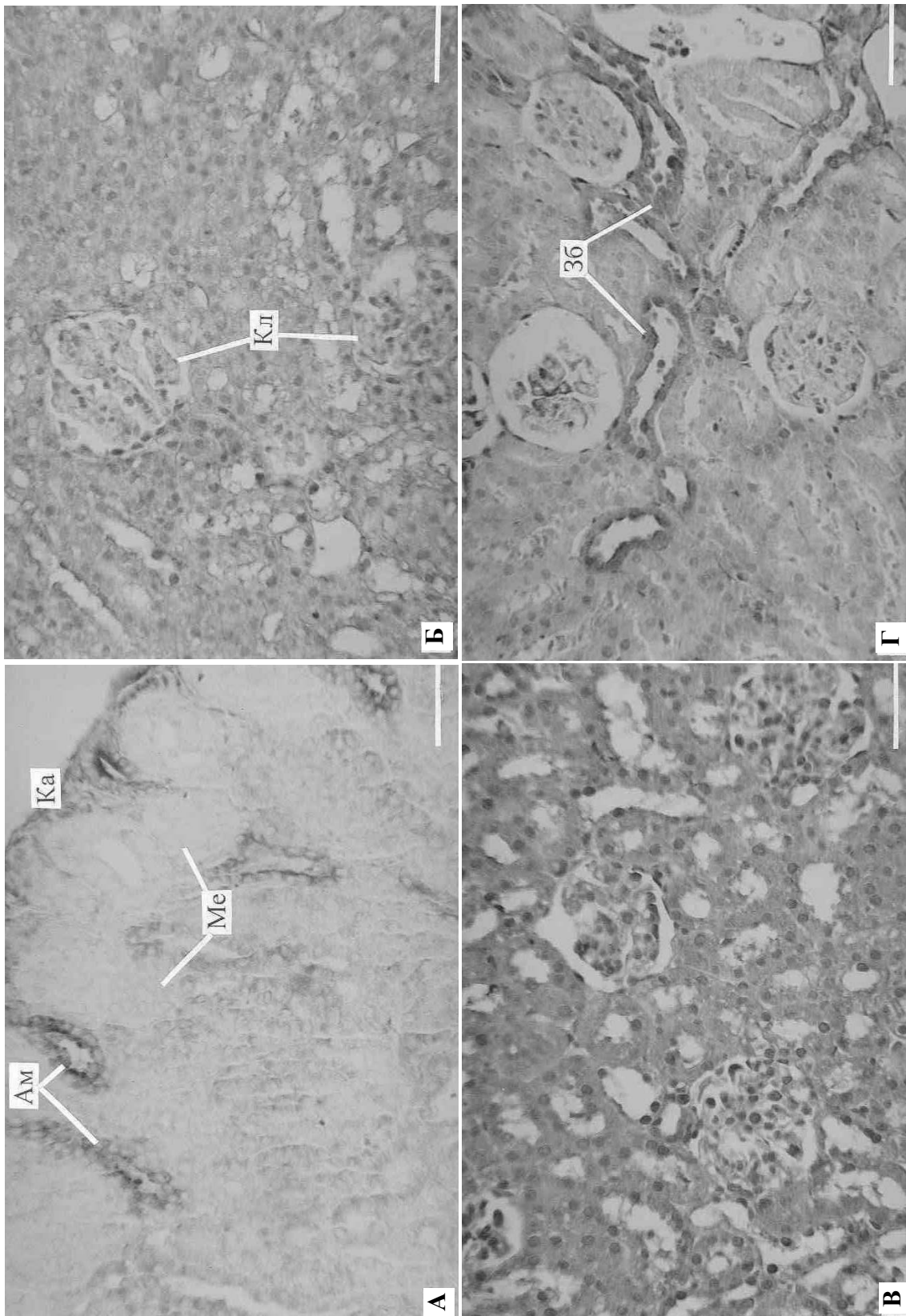


Рис. 1. Гістотопографія рецепторів лектину ТРА у нирці щурів І-ї (А), 20-ї (В), 120-ї (Г) діб постнатального онтогенезу і на 14-ту добу після ін'єкції стрептозотозину (Д). Об. 16, ок. 7. Масштабний відрізок – 50 мкм: Ка – капсула нирки; Ам – кінецьві амулли; Ме – ділянки метанефрогенної мезенхіми; Кл – клубочки; 3б – збірні ниркові протоки.

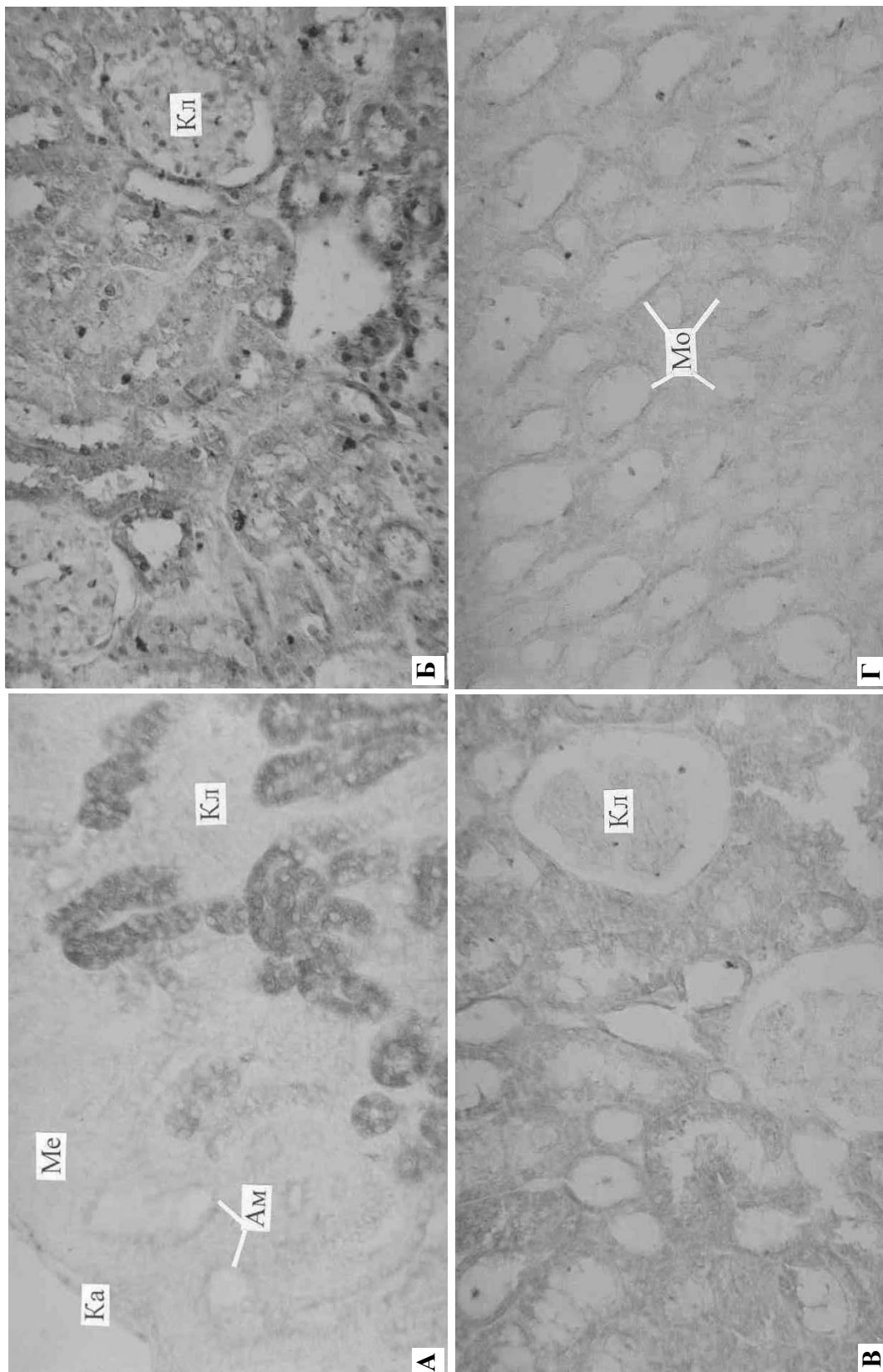


Рис. 2. Перерозподіл рецепторів лектину LISA у нирці щурів упродовж постнатального онтогенезу та при розвитку стрептозотозин-індукованої діабетичної нефропатії. А – 1-ша доба після народження. Б – 120-та доба після народження. В, Г – 60-та доба після введення стрептозотозину. А, Б, В, Г – об. 16, ок. 7, масштабний відрізок – 50 мкм: Ка – капсула нирки; Ам – кінець ампули; Ме – ділянки мезанефрогенної мезенхіми; Кл – клубочки; Мо – мозкові ниркові трубочки.

ниркових трубочок у складі мозкової речовини (рис. 2-Г).

У цьому дослідженні вперше для характеристики перерозподілу і якісних змін глікополімерів нирки щура в динаміці постнатального онтогенезу та при моделюванні стрептозотозин-індукованої ДН використано п'ять фукозоспецифічних лектинів, серед них два оригінальних лектини – з кори та насіння бобовника Золотого дощу (LAVA та LASA відповідно) [4]. Задокументована нами специфіка гістохімічної реактивності застосованих лектинів, очевидно, зумовлена тонкими відмінностями їх афінності до олігосахаридних ланцюгів різної структури [4].

Виявлена у роботі тенденція до акумулювання та генералізації фукозогліканів у цитоплазмі нефроцитів узгоджується із закономірностями перерозподілу вуглеводів та вуглеводовмісних біополімерів упродовж постнатального онтогенезу нирки, що показано іншими авторами з використанням класичних гістохімічних методів (Н.А. Богомолова, 1965). Тепер ці дані доповнені характеристикою якісного складу їхніх олігосахаридних детермінант. Експресія рецепторів переважної більшості використаних лектинів у ядрах нефроцитів, починаючи з 20-ї постнатальної доби, правдоподібно зумовлена посиленням процесів гетерохроматинізації при завершенні формування нирки як органа, що знаходить своє підтвердження в дослідженнях, проведених з використанням інших методичних підходів [9].

Виявлена нами редукція фукозогліканів у процесі розвитку стрептозотозин-індукованої ДН може бути зумовлена як порушеннями процесів кінцевого глікозилування (неприєднанням залишків LFuc до олігосахаридних ланцюгів біополімерів), так і посиленням розщеплення і вимивання глікокон'югатів як наслідку метаболічних змін при ЦД. Існування обох названих ме-

ханізмів при ДН було показано для сіалогліканів гепаран-сульфатів фільтраційного бар'єру [2, 3]. Зазначимо також, що виявлені закономірності перерозподілу фукозогліканів значною мірою корелювали із задокументованою нами раніше у тих самих групах експериментальних тварин редукцією манозо-(глюкозо)-гліканів, що може свідчити про загальний характер редукції глікополімерів нирки у процесі розвитку ДН.

**Висновки та перспективи подальших досліджень.** 1. Постнатальний морфогенез нирки щура характеризується накопиченням та генералізацією глікополімерів з кінцевими нередукуючими залишками LFuc як в цитоплазмі, так і в складі ядер клітинних елементів паренхіми нирки. 2. У процесі розвитку стрептозотозин-індукованої діабетичної нефропатії виявлено редукцію фукозогліканів у цитоплазмі нефроцитів з одночасним посиленням контурування люменальної поверхні проксимальних і дистальних трубочок, збірних ниркових проток. Вищезначені закономірності носять загальний характер, оскільки значною мірою нагадують задокументований нами раніше перерозподіл у нирках тих же експериментальних груп тварин манозо-(глюкозо)-гліканів. 3. Порівняння методів лектинової гістохімії із загальноморфологічними методами показало, що перші є чутливішими і дозволяють раніше – вже на 14-ту добу після введення стрептозотозину – ідентифікувати морфогістохімічні ознаки розвитку діабетичної нефропатії. 4. Отримані дані доповнюють існуючі уявлення про гістохімічні прояви постнатального морфогенезу нирки і розвитку діабетичної нефропатії, а також демонструють перспективність подальшого застосування оригінальних лектинів LAVA і LASA для вивчення перерозподілу глікополімерів у динаміці онтогенезу та гістопатології.

### Література

1. Тронько М.Д. Основні показники діяльності ендокринологічної служби України / Тронько М.Д. – К., 2005.
2. Бондарь И.А. Гликозаминогликаны и диабетическая нефропатия / И.А.Бондарь, В.В.Климонтов // Пробл.

ендокринол. – 2004. – 2. – С. 29-34. 3. Дедов И.И. Диабетическая нефропатия / И.И.Дедов, М.В.Шестакова. – М.: Универсум Паблишинг, 2000. 4. Антонюк В.О. Лектины та їх сировинні джерела / Антонюк В.О. – Львів: Кварт, 2005. 5. Волошин Н.А. Использование лектиновой гистохимии в морфологии / Н.А.Волошин, Е.А.Григорьева, М.А.Довбыш // Тавр. медико-биол. вестн. – 2004. – № 4. – С. 40-41. 6. Яценко А.М. Лектинова гистохімія печінки щура при стрептозотоцин-індукованому цукровому діабеті / А.М.Яценко, Л.В.Балуш, О.Д.Луцик // Вісн. морфол. – 2008. – № 1. – С. 239-245. 7. Амбарова Н.О. Характер зв'язування лектинів різної вуглеводної специфічності з глікополімерами нирки новонароджених щурів / Н.О.Амбарова, О.Д.Луцик // Acta Med. Leopold. – 2007. – № 4. – С. 59-66. 8. Holthofer H. Cell type-specific glycoconjugates of collecting duct cells during maturation of the rat kidney / H.Holthofer // Cell Tissue Res. – 1988. – Vol. 253. – P. 305-309. 9. Spatiotemporal expression patterns of sialoglycoconjugates during nephron morphogenesis and their regional and cell type-specific distribution in adult rat kidney / C.Zuber, J.C.Paulson, V.Toma [et al.] // Histochem. Cell. Biol. – 2003. – Vol. 120. – P. 143-160.

### **ФУКОЗОГЛИКАНЫ ПОЧКИ КРЫСЫ: ПЕРЕРАСПРЕДЕЛЕНИЕ В ДИНАМИКЕ ПОСТНАТАЛЬНОГО ОНТОГЕНЕЗА И В ПРОЦЕССЕ РАЗВИТИЯ СТРЕПТОЗОТОЦИН-ИНДУЦИРОВАННОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА**

**Резюме.** С использованием пяти фукозоспецифичных лектинов (TPA, LLA, PFA, LABA и LASA) исследовано перераспределение гликоконъюгатов почки крысы в динамике постнатального онтогенеза (1, 20, 60, 120 сутки) и на 14, 30, 60, 80 сутки после инъекции стрептозотоцина. Постнатальный онтогенез сопровождался накоплением и генерализацией рецепторов всех использованных лектинов в составе цитоплазматических и ядерных гликополимеров нефроцитов, клеток почечных телец; наивысшая интенсивность перераспределения наблюдалась в промежутке между 1 и 20 сутками. Развитие диабетической нефропатии проявлялось редукцией фукозогликанов в составе паренхиматозных элементов почки с одновременным контурированием люменальной поверхности проксимальных и дистальных трубочек, собирательных протоков.

**Ключевые слова:** лектиновая гистохимия, диабетическая нефропатия, онтогенез.

### **FUCOSOGLYCANS OF RAT KIDNEY: REDISTRIBUTION IN THE DYNAMICS OF POSTNATAL ONTOGENESIS AND IN STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES**

**Abstract.** By using five flucose-specific lectins (TPA, LLA, PFA, LABA and LASA) a distribution of glycoconjugates of the rat kidney has been investigated in the dynamics of postnatal ontogenesis (days 1, 20, 60, 120) and on the 14th, 30th, 60th, 80th days of the development of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. Postnatal ontogenesis is accompanied with an accumulation and generalization of the receptors of all the mentioned lectins in the composition of cytoplasmatic and nuclear glycopolymers of nephrocytes, the cells of the renal corpuscles; the most intensive redistribution of glycoconjugates was documented during the period from day 1 and day 20. The development of diabetic nephropathy was expressed by a reduction of fucoglycans in the composition of parenchymatons elements of the kidney with simultaneous contouring of the luminal surface of the proximal and distal tubules, collecting renal ducts.

**Key words:** lectin histochemistry, diabetic nephropathy, ontogenesis.

Danylo Halyts'kyi National Medical University (L'viv)

Надійшла 06.11.2008 р.  
Рецензент – проф. К.С.Волков (Тернопіль)