

**ПЕРЕРОЗПОДІЛ ГАЛАКТОКОН'ЮГАТИВ У ПРЕНАТАЛЬНОМУ
ОРГАНОГЕНЕЗІ НИРОК ЩУРІВ, ЩО РОЗВИВАЛИСЯ
ПІД ВПЛИВОМ ЕНАЛАПРІЛА**

І.Ю.Акиншевич, аспірант*

***О.Ю.Шаповалова, доктор медичних наук
ДУ «Кримський державний медичний університет
імені С.І. Георгієвського»***

Вивчено органогенез остаточних нирок ембріонів і плодів 64 самиць щурів породи Вістар, отриманих в чотирьох серіях експерименту, у віці з 13 до 21 доби нормальної вагітності і від самок, що отримували терапевтичну, субтоксичну і токсичну дозу еналапріла. Макромолекули, що містять кінцеві нередукуючі залишки N-ацетіл-D-галактозаміна, що взаємодіють з лектинами сої, помірно накопичуються у зародків у віці 13–14 діб. До 21-ї доби відбувається накопичення лектин-позитивних з'єднань у структурних компонентах остаточної нирки. Найменш істотні перебудови лектин-рецепторних систем у клітинах і міжклітинній речовині остаточних нирок виявляються після прийому еналапріла у терапевтичній дозі, і найбільш істотні – після застосування субтоксичної дози.

Еналапріл, лектини сої, метанефрос, плоди, органогенез, щури, вагітність.

При диференціації, яка є ключовим аспектом ембріонального гістогенезу, разом з появою клітинної гетерогенності, відбувається ускладнення структурно-функціональної організації клітин у ході реалізації наявних потенцій [7], яскравим проявом якої є зміна вуглеводних детермінант плазматичних мембран, секреторних включень і неклітинних структур. Новим сучасним методологічним підходом до вивчення глікополімерів, якими є глікопротеїни і гліколіпіди, у клітинах і тканинних екстрацелюлярних структурах, зокрема у процесі ембріонального диференціювання, є лектиногістохімія [3, 4, 8]. Зміна генома ембріонів, що призводить до різних потворностей [13], різноманітних захворювань [2], або до зміни умов імплантації [6] спричиняють порушення синтезу глікополімерів клітин і екстрацелюлярних структур, і відповідно змінює гістотопографію рецепторів лектинів.

Постнатальна гіпертонія і інші захворювання нирок програмуються в ембріональному періоді, коли нормальний розвиток органу може порушуватися за різних зовнішніх чинників, у тому числі і лікарських речовин, що застосовують жінки для лікування соматичної патології [12,

* Науковий керівник – доктор медичних наук О.Ю.Шаповалова

14]. Найнебезпечнішою соматичною патологією, що потребує обов'язкової медикаментозної корекції, є гіпертонія, яка призводить до еклампсії і загибелі жінки. Зведення про перебудови лектин-рецепторних систем при розвитку нирок під впливом еналапріла нами не виявлені.

Мета дослідження – вивчення репресії і дерепресії глікополімерів з кінцевими нередукуючими залишками N-ацетіл-D-галактозаміна на поверхні і у цитоплазмі клітин паренхіми, строми і у тканинних екстрацелюлярних структурах нирок щурів у нормі і під впливом еналапріла.

Матеріал і методи дослідження. У дослідженні використані остаточні нирки ембріонів і плодів 64 самок білих щурів породи Вістар, отриманих у чотирьох серіях експерименту, у віці з 13- по 21-у добу нормальної вагітності і від самок, що отримували терапевтичну, субтоксичну і токсичну дозу еналапріла. Експерименти виконували з дотриманням принципів гуманності, викладених у директиві Європейського Співтовариства(86/609/ЕС), і згідно з «Правила проведення робіт з використанням експериментальних тварин».

З отриманого матеріалу були виготовлені серійні парафінові зрізи завтовшки 5 мкм. Оглядові препарати фарбували гематоксиліном і еозином [5]. N-ацетіл-D-галактозамінокон'югати виявляли шляхом обробки серійних зрізів лектинами сої, кон'югованими з пероксидазою хрину. Препарати обробляли із застосуванням стандартних наборів НПК «Лектинотест» м. Львів у розведенні лектинів 1:50 за методикою, що рекомендувалася [9]. Візуалізацію місць скріплення лектинів проводили у системі діамінобензидин–перекис водню. Контроль специфічності реакції здійснювали за виключення із схеми обробки препаратів діамінобензидину. Лектини сої (SBA) є специфічними до кінцевих нередукуючих залишків N-ацетіл-D-галактозаміна. Специфічність лектинів до термінальних нередукуючих моносахаридних залишків глікокон'югатів подана відповідно до даних [1]. Інтенсивність фарбування зрізів лектинами оцінювалася в балах двома дослідниками незалежно один від одного. Бали 0, 1, 2, 3, 4 – відповідно відсутність, слабка, помірна, сильна і дуже сильна реакції.

Результати досліджень та їх обговорення. За літературними даними, у підвищенні адгезії клітин істотне значення мають глікокон'югати з кінцевими залишками N-ацетіл-D-галактозаміна [10, 11]. Макромолекули, що містять кінцеві нередукуючі залишки N-ацетіл-D-галактозаміна, що з'єднуються з лектинами сої, помірно синтезуються і накопичуються на апікальній і базальній поверхнях епітеліального вистилання каналців, що розвиваються, – гілок мезонефральної протоки у зародків у віці 13–14 діб. До 16-ї доби пренатального органогенезу SBA-біополімери експресуються у великій кількості в цитоплазмі клітин клубочків, що закладаються (табл. 1). Помірна кількість таких макромолекул присутня на апікальній поверхні клітин зовнішнього листка капсули і епітеліального вистилання каналців, а також у цитоплазмі епітелію каналців. Цитоплазма мезенхімоцитів бідна на продукти лектин-

рецепторної взаємодії, тоді як на цитолемі яскравість бензидинової мітки дещо вища.

У 17–19-добових плодів компоненти нефронів, що перебувають на найранніх етапах диференціювання, і клітини ембріональної сполучної тканини демонструють спорідненість до бензидинової мітки схожу з попередньою стадією розвитку. Перерозподілу кількості і гістотопографії рецепторів лектинів сої не відбувається.

До кінця пренатального органогенезу на 20–21 добу відбувається накопичення лектин-позитивних з'єднань у структурних компонентах остаточної нирки (табл. 1). Яскравість забарвлення збільшилась у цитоплазмі клітин зовнішнього листка капсули, каналців і клітин ембріональної сполучної тканини. Стабільно високою залишається концентрація N-ацетіл-D-галактозамінокон'югатів у цитоплазмі клітин судинних клубочків.

1. Кількісний вміст рецепторів лектину сої (SBA) в епітеліальних і мезенхімних закладах остаточної нирки контрольної групи*

Структура	Вік зародків, діб							
	13	14	16	17	18	19	20	21
Клітини судинного клубочка:								
цитолема	-	-	0	0	0	0	0	0
цитоплазма	-	-	3	3	3	3	3	3
Клітини зовнішнього листка капсули:								
апикальна поверхня	-	-	2	2	2	2	2	2
базальна поверхня	-	-	1	1	1	1	1	1
цитоплазма	-	-	1	1	1	1	2	2
Епітелій каналців:								
апикальна поверхня	2	2	2	2	2	2	2	2
базальна поверхня	1	1	1	1	1	1	1	1
цитоплазма	2	2	2	2	2	2	3	3
Клітини мезенхіми:								
цитолема	2	2	2	2	2	2	2	2
цитоплазма	1	1	1	1	1	1	1	2

*Інтенсивність розвинутої реакції оцінювали в балах: 0 – відсутність реакції; 1 бал – слабка реакція; 2 бали – помірна реакція; 3 бали – сильна реакція; 4 бали – дуже сильна реакція

У ембріонів щурів, що розвиваються під впливом терапевтичної дози еналапріла, на 14 добу пренатального онтогенезу в каналцях, похідних метанефротичної протоки, спостерігається дуже низький рівень біосинтезу SBA-макромолекул на базальній поверхні епітеліального вистилання. У цитоплазмі епітеліоцитів і на їх апікальній поверхні рецепторів лектинів сої помірні кількість. Клітини навколишньої мезенхіми також бідні на лектин-позитивний матеріал (табл. 2).

У віці 16 діб клітини нефронів, що перебувають у S-подібній стадії, накопичують помірну кількість глікополімерів із вуглеводною

детермінантою N-ацетил-D-галактозаміна у цитоплазмі клітин судинних клубочків і на апікальній і базальній поверхнях парієтального листка капсули ниркових тілець. Сліди бензидинової мітки виявляються у цитоплазмі клітин капсули. Цитолема клітин судинних клубочків залишається повністю ареактивною. Епітелій каналців не змінює експресію лектин-позитивного матеріалу порівняно з попередньою стадією розвитку.

2. Кількісний вміст рецепторів лектину сої (SBA) в епітеліальних і мезенхімних закладках метанефроса, що розвивалися під впливом еналапріла*

Структура	Терапевтична доза							Субтоксична доза							Токсична доза							
	Вік зародків, діб																					
	14	16	17	18	19	20	21	14	16	17	18	19	20	21	14	16	17	18	19	20	21	
Клітини судинного клубочка:																						
цитолема	-	0	0	2	2	2	1	-	0	3	3	3	4	4	-	0	2	2	2	2	1	1
цитоплазма	-	2	2	1	1	1	1	-	2	2	2	2	3	3	-	2	2	1	1	1	1	1
Клітини зовнішнього листка капсули:																						
апікальна поверхня	-	2	2	1	1	1	2	-	2	0	0	0	0	0	-	2	1	1	1	1	1	1
базальна поверхня	-	2	2	1	1	1	1	-	2	0	0	0	0	0	-	2	1	1	1	0	0	0
цитоплазма	-	1	1	0	0	0	0	-	1	2	2	2	1	1	-	1	1	1	0	1	0	0
Епітелій каналців:																						
апікальна поверхня	2	2	3	3	3	2	2	2	3	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2
базальна поверхня	1	1	2	2	2	1	0	2	2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	1	1
цитоплазма	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1
Клітини мезенхіми:																						
цитолема	2	3	3	3	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1	2	2	3	3	1	1	1	1
цитоплазма	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	3	3	1	1	1	1	2	2	2	2

*Інтенсивність розвинутої реакції оцінювали в балах: 0 – відсутність реакції; 1 бал – слабка реакція; 2 бали – помірна реакція; 3 бали – сильна реакція; 4 бали – дуже сильна реакція

Починаючи з 17- до 20-ї доби, гістотопографія місць зв'язування лектинів сої дещо змінюється. Такі макромолекули переміщуються з цитоплазми на цитолему клітин судинних клубочків. Спорідненість клітин зовнішнього листка капсули ниркових тілець у лектинів сої помітно

зменшується. Це стосується апікальної і базальної поверхонь епітеліоцитів. Цитоплазма їх позбавляється таких біополімерів. Канальцевий епітелій і клітини ембріональної сполучної тканини, навпаки, збагачуються сайтами зв'язування лектинів сої до великих показників на апікальній поверхні і на цитолемі (табл. 2). Дещо менше SBA-позитивного матеріалу на базальній поверхні. Сліди бензидинової мітки є видимими в цитоплазмі епітеліоцитів і клітин ембріональної сполучної тканини. В період 21-ї доби гестації вивчені закладки остаточної нирки збіднені на рецептори лектинів сої. Це стосується клітин судинних клубочків і ембріональної сполучної тканини, де таких макромолекул – мінімальна кількість. На базальній поверхні епітелію канальців N-ацетіл-D-галактозамінокон'югати повністю редукуються.

При введенні субтоксичної дози еналапріла на первинних етапах розвитку (13–16 діб) всі структури закладок нирок проявляють рівномірну слабку тропність до лектинів сої (табл. 2).

Розподіл глікополімерів з кінцевими нередукуючими залишками N-ацетіл-D-галактозаміна, що з'єднуються з лектинами сої, у 14-добового ембріона, що розвивався під впливом субтоксичної дози еналапріла, характеризується помірною присутністю лектин-зв'язаних сайтів на апікальній і базальній поверхнях епітеліоцитів канальців і на цитолемі мезенхімоцитів (табл. 2). Сегменти метанефронів, що диференціюються, у 7–19-добових плодів мають різну щільність рецепторів до лектинів сої. Їх багато на цитолемі клітин судинних клубочків. Цитоплазма цих клітин трохи блідіша. Апікальна і базальна поверхні клітин зовнішнього листка капсули ниркових тілець втрачають такі з'єднання. Всі компоненти клітин епітелію канальців забарвлюються однаково слабо, як і цитолема клітин ембріональної сполучної тканини. Цитоплазма останніх клітин помірно багата на N-ацетіл-D-галактозамінокон'югати.

На наступних етапах диференціювання нефронів (20–21 доба) помітно збільшується спорідненість клітин судинних клубочків і клітин ембріональної сполучної тканини до лектинів сої, що призводить до появи дуже великої кількості SBA-рецепторів на цитолемі клітин судинних клубочків і великої кількості – у цитоплазмі клітин судинних клубочків і клітин ембріональної сполучної тканини.

Під впливом токсичної дози еналапріла закладка і розвиток нефронів у кірковій речовині остаточної нирки у віці зародків 14–21 доби супроводжується не такою яскравою зміною експресії і гістотопографії рецепторів до лектинів сої порівняно з контрольною групою, ніж при введенні субтоксичної дози препарату. У віці 16-ти діб S-образна закладка метанефронів споріднена з бензидиновою міткою, яка помірно виражена, так як і в епітелії канальців і на цитолемі мезенхімоцитів (табл. 2). Цитоплазма клітин клубочків і мезенхіми і базальна поверхня клітин зовнішнього листка капсули слабо реагує на фарбування. Повністю відсутня бензидинова мітка на цитолемі клітин судинних клубочків.

У більш старшому віці (17–20 діб) з'являються і піддаються диференціюванню елементи ниркових тілець і канальцевої системи, хоча

концентрація SBA-біополімерів змінюється мало. До того ж епітеліоцити каналців і судинних клубочків містять дещо більше кінцевих залишків N-ацетіл-D-галактозаміна, ніж складові компоненти зовнішнього листка капсули, які експресують дуже мало SBA-рецепторів. Проте вже більш диференційовані нефрони (21 доба) мають ще меншу лектин-зв'язуючу здатність (табл. 2). Базальна поверхня і цитоплазма клітин зовнішнього листка капсули втрачають такі біополімери.

У мезенхімних клітинах простежується перерозподіл SBA-матеріалу. У міру її диференціювання в ембріональну сполучну тканину рецептори лектинів сої накопичуються на цитолемі клітин до високих показників (плоди 17–18 діб), а потім на цитолемі залишаються тільки сліди бензидинової мітки (плоди 20–21 доба). Цитоплазма дещо збагачується на N-ацетіл-D-галактозамінокон'югати.

Висновки

1. Макромолекули, що містять кінцеві нередукуючі залишки N-ацетіл-D-галактозаміна, що взаємодіють з лектином сої, помірно накопичуються на апікальній поверхні клітин зовнішнього листка капсули і епітеліального вистилання каналців, а також у цитоплазмі каналцевого епітелію зародків у віці 13–14 діб. До кінця пренатального органогенезу на 20–21-у добу відбувається накопичення лектин-позитивних сполук в структурних компонентах остаточної нирки.

2. У ембріонів щурів, матері яких отримували досліджувані дози еналапріла, найменш суттєва перебудова лектин-рецепторних систем в клітинах і міжклітинній речовині остаточних нирках виявляється після прийому еналапріла в терапевтичній дозі, і найбільш суттєва – після застосування субтоксичної дози.

Список літератури

1. Антонюк В. О. Лектини та їх сировинні джерела / Антонюк В.О. – Львів: ПП „Кварт”, 2005. – 458 с.

2. Вагин Д.В. Выявление перераспределения гликоконъюгатов – рецепторов к лектинам при аллергическом и гнойном воспалении по сравнению с нормой / Д.В.Вагин, Е.Ю.Шаповалова, А.Г.Балабанцев // ЖУНГБ. – 2003. – № 2. – С. 40.

3. 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.

4. Галич И.П. Изменение гликозилирования при онкогенезе и развитии других патологических процессов / И.П.Галич, Н.В.Евтушенко // Онкология. – 2003. – Т. 5, №1. – С. 4–9.

5. Горальський Л.П. Основи гістологічної техніки і морфофункціональні методи досліджень у нормі та при патології / Л.П.Горальський, В.Т.Хомич, О.І.Кононський. – Житомир: Полісся, 2011. – 215 с.

6. Демьяненко И.А. Органные особенности раннего гистогенеза дыхательной системы человека в условиях маточной и трубной имплантации / И.А.Демьяненко, Е.Ю.Шаповалова // Морфология –2007. – Т. 131, №3. – С. 92–93.

7. Клишов А.А. Гистогенез и регенерация тканей / Клишов А.А. – Л.: Медицина, 1984. – 232 с.
8. Королев Н.П. Функции лектинов в клетке / Н.П.Королев // Итоги науки и техники. Сер. Общие проблемы физиологии, химии и биологии. – 1984. – С.1–7.
9. Луцик А. Д. Лектины в гистохимии / Луцик А.Д., Детюк Е.С., Луцик М.Д. – Львов.: Вища школа, 1989. – 139 с.
10. Твердохлеб И.В., Шпонька И.С. Стереологические и лектиногистохимические характеристики морфогенетических механизмов в сердце млекопитающих / И.В.Твердохлеб, И.С.Шпонька // Український медичний альманах. – 1998. – № 3. – С.131–132.
11. Хомутовский О.А. Электронная гистохимия рецепторов клеточных мембран / Хомутовский О.А., Луцик М.Д., Передерей О.Ф. – К., 1986. – 243 с.
12. Alexander B. T. Fetal programming of hypertension / B.T.Alexander // Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. – 2006. – Vol. 290, N 1. – P. R1–R10.
13. Quondamatteo F. Extensive glycosylation changes revealed by lectin histochemistry in morphologically normal prenatal tissues of the mouse mutant undulated (un/un) / F.Quondamatteo, J.Zieger, W.Gotz // Anat. Rec. – 2000. – Vol. 258, N3. – P.243–251.
14. Zandi-Nejad K. Adult hypertension and kidney disease: the role of fetal programming / K.Zandi-Nejad, V.A.Luyckx, B.M.Brenner // Hypertension. – 2006. – Vol. 47, N 3. – P. 502–508.

Изучен органогенез окончательных почек плодов 64 самок крыс породы Вистар, полученных в четырех сериях эксперимента, в возрасте с 13- по 21-е сутки нормальной беременности и от самок, которые получали терапевтическую, субтоксичную и токсичную дозу эналаприла. Макромолекулы, содержащие конечные нередуцирующие остатки N-ацетил-D-галактозамина, взаимодействующие с лектином сои, накапливаются в умеренном количестве у зародышей в возрасте 13–14 суток. К 21-м суткам происходит накопление лектин-позитивных соединений в структурных компонентах окончательной почки. Наименее существенные перестройки лектин-рецепторных систем в клетках и межклеточном веществе окончательных почек обнаруживаются после приема эналаприла в терапевтической дозе, и наиболее существенные – после применения субтоксической дозы.

Эналаприл, лектин сои, метанефрос, плоды, органогенез, крысы, беременность.

Organogenesis of rat metanephros from 13th for the 21th days of gestation from 64 Vistar female rats got in seven series of experiment were investigated. Metanephros of control group and enalapril received group with therapeutic, subtoxic and toxic dose were studied. Metanephros of control group embryos in age 13–14 days accumulate in generous amounts macromolecules with N-acetyl-D-galactosamin terminal residues that are binding sites of Soy Bean lectin. At the age of 21 days receptors of Soy Bean lectin increased in all structural components of metanephros. The least substantial alterations of the lectin-receptor systems in cells and extracellular matrix in metanephros presented after enalapril in a therapeutic dose, and most substantial – after subtoxic dose.

Enalapril, Soy Bean lectin, metanephros, fetus, organogenesis, rat, pregnancy.