

УДК 591.3+591.424+591.461.1/2:615.372+615:616-092.4

© И.Ю. Акиншевич, Е.Ю. Шаповалова, 2012.

ПЕРЕРАСПРЕДЕЛЕНИЕ ГАЛАКТОКОНЪЮГАТОВ В ПРЕНАТАЛЬНОМ ОРГАНОГЕНЕЗЕ ПОЧЕК КРЫС РАЗВИВАВШИХСЯ ПОД ВЛИЯНИЕМ ЭНАЛАПРИЛА И НИФЕДИПИНА

И.Ю. Акиншевич, Е.Ю. Шаповалова*Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав.кафедрой - проф. Е.Ю. Шаповалова) , Государственное учреждение «Крымский государственный медицинский университет им. С. И. Георгиевского», г. Симферополь.*

REDISTRIBUTION OF GALAKTOKON'YUGATES IN PRENATAL ORGANOGENESIS OF RAT KIDNEY DEVELOPING UNDER THE INFLUENCE OF ENALAPRIL AND NIFEDIPIN

I.Yu. Akinshevich, Ye. Yu. Shapovalova

SUMMARY

Organogenesis of rat metanephros from 13th for the 21th days of gestation from 112 «Vistar» female rats got in seven series of experiment were investigated. Control group metanephros and from females, getting the therapeutic, subtoxic and toxic dose of enalapril and nifedipin were studied. Metanephros of control group embryos in age 13-14 days accumulate in generous amounts macromolecules with beta-D-galactose terminal residues that are binding sites of peanut lectin. At the age of 21 days receptors of peanut lectin slightly reduced in all epithelial components of metanephros. The least substantial alterations of the lectin-receptor systems in cells and extracellular matrix are in metanephros after the reception of enalapril in a therapeutic dose, and most substantial – after application of subtoxic dose. At a nifedipin reception changes depends from the dose. They are most substantial after the reception of toxic dose and the least – after introduction of therapeutic dose.

ПЕРЕРОЗПОДІЛ ГАЛАКТОКОН'ЮГАТОВ В ПРЕНАТАЛЬНОМУ ОРГАНОГЕНЕЗІ НИРОК ЩУРІВ ЩО РОЗВИВАЛИСЯ ПІД ВПЛИВОМ ЕНАЛАПРИЛА І НІФЕДИПІНУ

І.Ю. Акіншевіч, О.Ю. Шаповалова

РЕЗЮМЕ

Вивчений органогенез остаточних нирок ембріонів і плодів 112 самиць щурів породи «Вістар», отриманих в семи серіях експерименту, у віці з 13-х по 21-у добу нормальної вагітності і від самок, що отримували терапевтичну, субтоксичну і токсичну дозу еналапріла і ніфедіпіна. Макромоллекули, які містять кінцеві нередукуючі залишки бета-D-галактози, що взаємодіють з лектином арахісу, накопичуються у великих кількостях в закладах метанефроса з найраніших етапів розвитку органу у зародків контрольної групи у віці 13-14 дб. До 21 доби відбувається деяка редукція рецепторів лектину арахісу у всіх епітеліальних структурах метанефронів. Найменш істотні перебудови лектин-рецепторних систем в клітинах і міжклітинній речовині метанефроса виявляються після прийому еналапріла в терапевтичній дозі, і найбільш істотні – після застосування субтоксичної дози. При прийомі ніфедіпіна найбільш істотні зміни спостерігаються після прийому токсичної дози і найменш істотні – після введення терапевтичної дози.

Ключевые слова: еналапріл, ніфедипін, лектини, метанефрос, щури.

Как отмечено в классических работах о закономерностях эмбрионального гистогенеза, лежащего в основе пренатального органогенеза человека и млекопитающих, именно молекулярные перестройки в клетках и неклеточных структурах обуславливают дифференцировку клеток, становление их рецепторного аппарата и образование межклеточных контактов [4, 5, 6]. Ярким проявлением таких молекулярных трансформаций является изменение гликоконъюгатов в составе плазматических мембран, секреторных включений и компонентов межклеточного матрикса [2]. При этом синтез и последовательность появления гликоконъюгатов в клетках генетически детерминированы [12]. На сегодняшний день лектины являются наиболее информативным классом реагентов

таких соединений, т.е. рецепторы лектинов – это гликополимеры [2, 7]. Постнатальная гипертония и другие заболевания почек программируются в эмбриональном периоде, когда нормальное развитие органа может нарушаться под влиянием различных внешних факторов, в том числе и лекарственных веществ, принимаемых женщиной для лечения соматической патологии [10, 14]. Наиболее грозной соматической патологией, требующей обязательной медикаментозной коррекции, является гипертония, которая приводит к эклампсии и гибели женщины. Существует насущная необходимость обширных контролируемых исследований, чтобы установить какая антигипертензивная терапия менее рискована для матери и плода [11, 12]. Сведения о перестройках лектин-рецептор-

ных систем при развитии почек под влиянием нифедипина и эналаприла нами не обнаружены.

Целью работы явилось изучение репрессии и дерепрессии гликополимеров с концевыми нередуцирующими остатками бета-D-галактозы на поверхности и в цитоплазме клеток паренхимы, стромы и в тканевых экстрацеллюлярных структурах почек крыс в норме и под влиянием эналаприла и нифедипина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании использованы окончательные почки эмбрионов и плодов 112 самок белых крыс породы «Вистар», полученных в семи сериях эксперимента, в возрасте с 13-х по 21-е сутки нормальной беременности и от самок, получавших терапевтическую, субтоксическую и токсическую дозу эналаприла и нифедипина. Эксперименты выполняли с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директиве Европейского Сообщества (86/609/ЕС), и согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Из полученного материала были изготовлены серийные парафиновые срезы толщиной 5 мкм. Обзорные препараты окрашивались гематоксилином и эозином [3, 8, 9]. Галактозаминконъюгаты выявляли путем обработки серийных срезов лектином арахиса конъюгированного с пероксидазой хрена. Препараты обрабаты-

вали с применением стандартных наборов НПК «Лектинотест» г. Львов в разведении лектина 1:50 по рекомендуемой методике [7]. Визуализацию мест связывания лектина проводили в системе диаминобензидин – перекись водорода. Контроль специфичности реакции осуществляли путем исключения из схемы обработки препаратов диаминобензидина. Лектин арахиса (PNA), специфичен к концевым нередуцирующим остаткам бета-D-галактозы. Специфичность лектина к терминальным нередуцирующим моносахаридным остаткам гликоконъюгатов дана в соответствии с данными [1]. 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

Интенсивное накопление макромолекул, содержащих концевые нередуцирующие остатки в-D-галактозы, взаимодействующие с лектином арахиса, обнаруживаются на ранних этапах развития метанефроса у 13-14 суточных зародышей. Лектин-позитивные соединения локализируются в большом количестве на апикальной и базальной поверхностях эпителиальной выстилки канальцев, являющихся производными метанефритического протока. В цитоплазме клеток таких соединений умеренное количество (таблица 1).

Таблица 1

Количественное содержание рецепторов лектина арахиса (PNA) в эпителиальных и мезенхимных закладках окончательной почки контрольной группы*

Название структуры	Возраст зародышей в сутках							
	13	14	16	17	18	19	20	21
Клетки сосудистого клубочка цитолемма	-	-	3	3	3	3	3	2
цитоплазма	-	-	2	2	2	2	2	1
Клетки наружного листка капсулы апикальная поверхность	-	-	2	2	2	2	2	1
базальная поверхность	-	-	1	1	1	1	1	1
цитоплазма	-	-	0	0	0	0	0	0
Эпителий канальцев								
апикальная поверхность	3	3	2	2	2	2	2	1
базальная поверхность	3	3	2	2	2	2	2	1
цитоплазма	2	2	1	1	1	1	1	1
Клетки мезенхимы цитолемма	2	2	2	1	1	1	1	1
цитоплазма	1	1	1	1	1	0	0	0

Примечание: *Интенсивность развившейся реакции оценивали в баллах: 0 – отсутствие реакции, 1 балл – слабая реакция, 2 балла – умеренная реакция, 3 балла – сильная реакция, 4 балла – очень сильная реакция.

К моменту появления и в течение активной дифференцировки (16-20 сутки) компонентов почечных телец из метанефрогенной бластемы фиксируется высокая концентрация PNA-позитивных молекул на цитолемме клеток наружного листка капсулы и умеренная в их цитоплазме, на апикальной поверхности клеток наружного листка капсулы, на апикальной и базальной поверхностях эпителия канальцев. Цитоплазма эпителиоцитов канальцев беднеет галактозаминоконъюгатами. Базальная поверхность клеток наружного листка капсулы содержат следы слабой лектинрецепторной реакции. Цитоплазма клеток наружного листка капсулы ареактивна на всех эта-

пах развития.

К 21 суткам происходит некоторая редукция рецепторов лектина арахиса во всех эпителиальных структурах метанефронов (см. табл. 1). Исключение составляет базальная поверхность клеток наружного листка капсулы, имеющая постоянную малую концентрацию рецепторов к лектину арахиса. На 13–14 сутки органогенеза, протекающего под воздействием терапевтической дозы эналаприла, не наблюдается изменение содержания рецепторов лектина арахиса в эпителиальных и мезенхимных закладках метанефроса по сравнению с контрольной группой (таблица 2).

Таблица 2

Количественное содержание рецепторов лектина арахиса (PNA) в эпителиальных и мезенхимных закладках метанефроса, развивавшихся под влиянием эналаприла*

Название структуры	Терапевтическая доза								Субтоксическая доза								Токсическая доза							
	Возраст зародышей в сутках								Возраст зародышей в сутках								Возраст зародышей в сутках							
	1 4	16 7	1 8	1 9	1 0	2 0	2 1	2 1	1 4	1 6	1 7	1 8	1 9	2 0	2 1	1 4	1 6	1 7	1 8	1 9	2 0	2 1		
Клетки сосудистого клубочка																								
цитолемма	-	2	2	0	0	0	1	-	1	1	1	3	3	4	-	2	2	1	1	1	1	3		
цитоплазма	-	2	2	3	3	3	2	-	0	0	0	1	1	2	-	1	1	2	2	2	2			
Клетки наружного листка капсулы																								
апикальная поверхность	-	2	1	1	1	1	0	-	1	1	1	1	2	2	-	1	1	0	0	1	1			
базальная поверхность	-	1	1	0	0	0	0	-	1	1	1	1	1	1	-	1	1	1	0	0	1			
цитоплазма	-	0	0	3	3	2	2	-	0	0	0	0	0	0	-	0	0	1	1	0	0			
Эпителий канальцев																								
апикальная поверхность	3	1	0	0	0	0	0	3	3	3	3	3	4	4	3	2	1	1	2	2	2			
базальная поверхность	3	0	0	0	0	0	0	3	2	1	0	0	1	2	2	1	1	1	1	1	1			
цитоплазма	2	2	3	3	3	4	4	2	1	3	3	2	2	0	1	1	2	2	2	0	0			
Клетки мезенхимы																								
цитолемма	2	2	1	0	0	0	0	2	2	2	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2			
цитоплазма	1	1	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2	1			

Примечание: *Интенсивность развившейся реакции оценивали в баллах: 0 – отсутствие реакции, 1 балл – слабая реакция, 2 балла – умеренная реакция, 3 балла – сильная реакция, 4 балла – очень сильная реакция.

У зародышей в возрасте 16-ти суток апикальная поверхность эпителиоцитов наружного листка капсулы нефронов, находящихся на S-образной стадии развития, и клетки сосудистых клубочков характери-

зуются наличием умеренного количества рецепторов лектина арахиса, которые являются гликополимерами с концевыми нередуцирующими остатками в-D-галактозы. Их немного на базальной поверхнос-

ти клеток наружного листка капсулы. Цитоплазма этих клеток полностью ареактивна. К моменту появления главных компонентов метанефронов, что характерно для отрезка времени 17-18 суток, в окончательной почке выявляются существенные сдвиги в биосинтезе рецепторов лектина арахиса. Такие соединения исчезают на базальной поверхности эпителиоцитов канальцев, базальной и апикальной поверхности клеток наружного листка капсулы, из цитолеммы клеток сосудистого клубочка и мезенхиоцитов. В цитоплазме же клеток метанефроса усиленно накапливаются галактоконъюгаты. В более поздние сроки развития (19-21 сутки) отмечается увеличение до максимальных значений плотности мест связывания лектина арахиса в цитоплазме клеток канальцев. Остальные изученные структуры почек постепенно беднеют РНА-положительными макромолекулами вплоть до полного исчезновения.

Малое количество β -D-галактозоконъюгатов, связывающихся с лектином арахиса, обнаружены в эпителии S-телец, появление которых подтверждает начавшееся развитие нефронов окончательной почки на 16 сутки эмбриогенеза у зародыша, развивавшегося под влиянием субтоксической дозы эналаприла. Апикальная поверхность канальцев имеет большое количество сайтов связывания лектина. На базальной поверхности их умеренное количество. Цитоплазма эпителиоцитов бедна такими соединениями. Клетки мезенхимы метанефроса синтезируют умеренное количество галактополимеров.

В хорошо определяемых на этапе 17-18 суток закладках нефронов первых генераций цветовая насыщенность реакции лектин-рецепторных взаимодействий мало отличается от таковой у зародышей в возрасте 16-ти суток (см. табл. 2). К концу пренатального развития (21 сутки) гистотопография рецепторов лектина арахиса существенным образом изменяется по сравнению с контролем. Некоторые компоненты клеток эпителиа почечных телец и канальцев очень активно синтезируют РНА-гликополимеры. На цитолемме клеток сосудистых клубочков и апикальной поверхности эпителиа канальцев присутствует крайне большое количество таких соединений. В цитоплазме клеток сосудистых клубочков, на апикальной поверхности клеток наружного листка капсулы и базальной поверхности эпителиа канальцев накапливается умеренное количество галактозаминоконъюгатов. Лектин-рецепторные взаимодействия отсутствуют в цитоплазме клеток наружного листка капсулы и канальцев.

При введении беременным животным эналаприла в токсической дозе на 16-е сутки развития апикальная и базальная поверхности и цитоплазма клеток эпителиальных зачатков метанефронов, находящихся на стадии S-образных телец, экспрессируют незначительное количество галактозоконъюгатов. В цитоплазме клеток наружного листка капсулы названные вещества отсутствуют.

В сформировавшихся структурах почечных телец и канальцев на 17-18 сутки наблюдается такой же уровень синтеза рецепторов лектина арахиса, как и у предыдущего возраста зародышей. Несколько снижается яркость бензидиновой метки на цитолемме клеток сосудистого клубочка и на апикальной поверхности клеток наружного листка капсулы. В результате дальнейшей дифференцировки (19-21 сутки), осуществляемой под воздействием токсической дозы эналаприла, происходит увеличение насыщенности конъюгатами цитолеммы клеток сосудистого клубочка до высокого уровня. Из цитоплазмы последних и клеток канальцев эти вещества исчезают совсем (см. табл. 2). Для клеток наружного листка капсулы и цитолеммы клеток канальцев изменения количества РНА-макромолекул не характерны.

Закладка элементов окончательной почки у зародышей в возрасте 16 дней под воздействием терапевтической дозы нифедипина сопровождается такой же экспрессией гликополимеров с концевыми нередуцирующими остатками бета-D-галактозы, как и в контрольной группе. Различия выявляются только в меньшем количестве таких соединений на цитолемме клеток сосудистых клубочков (таблица 3). Лектин-рецепторные взаимодействия несколько слабеют после появления и в ходе продолжающейся дифференцировки почечных телец и канальцевой системы метанефронов у 17-18 суточных зародышей (см. таблица 3).

Последующая дифференцировка (19-21 сутки) проявляется некоторой редукцией количества рецепторов лектина арахиса в эпителии клеток наружного листка капсулы почечных телец и в цитоплазме эпителиа канальцев метанефроса. В остальных структурах окончательной почки наблюдается стабильное содержание мест связывания лектина.

Плотность соединений, тропных к РНА, умеренна в эпителиоцитах S-образных закладок почечных телец крыс в возрасте 16-ти дней, развивавшихся под воздействием субтоксической дозы нифедипина. Следы бензидиновой метки имеются только на базальной поверхности клеток наружного листка капсулы телец. Цитоплазма этих клеток лишена рецепторов лектина арахиса. Клетки эпителиа канальцев сохраняют большое количество галактозаминоконъюгатов, за исключением цитоплазмы, где яркость бензидиновой метки умеренная. Вся мезенхима примерно в одинаковой мере слабо накапливает продукт лектинрецепторного взаимодействия в цитоплазме и умеренно на цитолемме (см. табл. 3). Существенные изменения в содержании рецепторов лектина арахиса прослеживаются к концу пренатального развития окончательной почки (21-й день). Изменения затрагивают цитолемму клеток сосудистых клубочков, цитоплазму клеток наружного листка капсулы и канальцев. В этих структурах происходит снижение содержания мест связывания рецепторов лектина арахиса, за исключением цитоплазмы эпителиоци-

тов канальцев, которая имеет умеренную степень цветовой насыщенности.

Таблица 3

Количественное содержание рецепторов лектина арахиса (PNA) в эпителиальных и мезенхимных закладках метанефроса, развивавшихся под влиянием нифедипина*

Название структуры	Терапевтическая доза							Субтоксическая доза							Токсическая доза							
	Возраст зародышей в сутках							Возраст зародышей в сутках							Возраст зародышей в сутках							
	1 4	16 7	1 8	1 9	1 0	2 0	2 1	1 4	1 6	1 7	1 8	1 9	2 0	2 1	1 4	1 6	1 7	1 8	1 9	2 0	2 1	
Клетки сосудистого клубочка																						
цитолемма	-	2	2	2	2	2	2	-	2	2	2	2	2	1	-	2	2	1	1	1	1	1
цитоплазма	-	2	2	2	2	2	2	-	2	1	1	1	1	1	-	1	1	1	1	1	1	0
Клетки наружного листка капсулы																						
апикальная поверхность	-	2	1	1	2	2	1	-	2	1	1	1	1	1	-	2	2	2	3	3	3	3
базальная поверхность	-	1	2	2	2	2	1	-	1	2	2	2	2	2	-	2	2	2	2	2	2	2
цитоплазма	-	0	1	1	1	1	1	-	0	1	1	1	0	0	-	1	1	1	0	0	0	0
Эпителий канальцев																						
апикальная поверхность	3	3	3	3	3	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4
базальная поверхность	3	3	2	2	2	2	2	3	3	2	2	3	3	3	3	2	2	3	3	3	3	3
цитоплазма	2	2	2	2	2	1	1	2	2	1	1	1	1	2	2	1	1	2	2	2	2	2
Клетки мезенхимы																						
цитолемма	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3
цитоплазма	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	1	1	1	2	2	2	2	1

Примечание: *Интенсивность развившейся реакции оценивали в баллах: 0 – отсутствие реакции, 1 балл – слабая реакция, 2 балла – умеренная реакция, 3 балла – сильная реакция, 4 балла – очень сильная реакция.

Токсическая доза нифедипина наиболее сильно изменяет гистотопографию и количество рецепторов лектина арахиса в эпителиальных и мезенхимных закладках метанефроса по сравнению с контрольной группой. К концу изученного периода (21-й день) клетки эпителиальных и мезенхимных закладок окончательной почки, за исключением клеток сосудистых клубочков, проявляют высокую тропность к данному лектину. Очень много мест связывания лектина арахиса появилось на апикальной поверхности эпителиальной выстилки канальцев. Цитоплазма клеток сосудистых клубочков и наружного листка капсулы лишилась рецепторов лектина арахиса. Бензидиновая метка стала не яркой в цитоплазме клеток эмбриональной соединительной ткани.

ВЫВОДЫ

1. Макромолекулы, содержащие концевые нередуцирующие остатки β -D-галактозы, взаимодействующие с лектином арахиса, накапливаются в больших количествах в закладках метанефроса с самых ранних этапов развития органа у зародышей контрольной группы в возрасте 13-14 суток. К 21 суткам происходит некоторая редукция рецепторов лектина арахиса во всех эпителиальных структурах метанефронов.

2. У эмбрионов крыс, матери которых получали исследуемые дозы эналаприла, наименее существенные перестройки лектин-рецепторных систем в клетках и межклеточном веществе окончательных почках обнаруживаются после приема эналаприла в те-

рапевтической дозе, и наиболее существенные – после применения субтоксической дозы.

3. У эмбрионов крыс, матери которых получали исследуемые дозы нифедипина, наблюдается изменение количества и гистотопографии галактоконъюгатов в структурных компонентах метанефроса. Наиболее существенны они после приема токсической дозы и наименее существенны – после введения терапевтической дозы.

Перспективы дальнейших исследований. Сравнительное изучение особенностей перераспределения галактоконъюгатов, обеспечивающих адгезию клеток, в органогенезе метанефроса крыс под влиянием блокатора АПФ эналаприла и блокатора кальциевых каналов нифедипина способствует выяснению особенностей морфологических нарушений в строении органа в условиях гипотензивной терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антонюк В. О. Лектины та їх сировинні джерела / В. О. Антонюк. – Львів, ПП „Кварт”, 2005. – 458 с.
2. 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.
3. Горальський Л. П. Основи гістологічної техніки і морфологічних методів досліджень у нормі та при патології / Л. П. Горальський, В. Т. Хомич, О. І. Кононський. – Житомир «Полісся», 2011. – 215 с.
4. Данилов Р. К. Экспериментально-гистологический анализ гистогенеза и регенерации тканей: достижения и перспективы дальнейших исследований / Р. К. Данилов // Морфологические основы гистогенеза и регенерации тканей. – СПб., 2001. – С. 3-4.
5. Клишов А. А. Гистогенез и регенерация тканей / А. А. Клишов. – Л.: Медицина, 1984. – 232 с.
6. Кнорре А. Г. Эмбриональный гистогенез (морфологические очерки) / А. Г. Кнорре. – Л.: Медицина, 1971. – 432 с.
7. Луцик А. Д. Лектины в гистохимии / А. Д. Луцик, Е. С. Детюк, М. Д. Луцик. – Львов.: Вища школа, 1989. – 139 с.
8. Руководство по гистологической, гистохимической и иммуногистохимической технике / Марковский В. Д., Сорокина И. В., Гольева Н. В. [и др.]. – Харьков, 2010. – 151 с.
9. Семченко В. В. Гистологическая техника / В. В. Семченко, С. А. Барашкова, В. И. Ноздрин. – Омск, 2006. – 289 с.
10. Alexander B. T. Fetal programming of hypertension / B. T. Alexander // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* – 2006. – V. 290, N 1. – P. R1-R10.
11. Magee L. A. Treating hypertension in women of child-bearing age and during pregnancy / L. A. Magee // *Drug Saf.* – 2001. – Vol. 24, № 6. – P. 457-474.
12. Montan S. Drugs used in hypertensive diseases in pregnancy / S. Montan // *Curr Opin Obstet Gynecol.* – 2004. – Vol. 16, N 2. – P. 111-115.
13. Ponder B. A. Y. Lectin histochemistry / B. A. Y. Ponder // *Immunocytochemistry. Practical applications in pathology and biology* (eds. J. M. Polak, S. van Noorden). Bristol., 1983, p. 129-142.
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.