

УДК 616.61-079:[616-018:547.96:582.28]-07

Н. О. Амбарова

Національний медичний університет ім. Д. Галицького, м. Львів

ЛЕКТИН ГРИБА ГРУЗЛИКА ДИМЧАСТОГО (*CLITOSYBE NEBULARIS* FR.): НОВИЙ ГІСТОХІМІЧНИЙ РЕАГЕНТ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ МОРФОГЕНЕЗУ ТА ГІСТОПАТОЛОГІЇ НИРКИ

На прикладі постнатального морфогенезу нирки щура та з використанням експериментальної моделі діабетичної нефропатії досліджено можливість використання лектину гриба грузлика димчастого (CNFA) в якості гістохімічного реагента. Показано, що означений лектин може бути використаний в якості селективного маркера ниркових тілець і щіткової облямівки проксимальних трубочок нефронів щура, для морфометричних досліджень, а також як достатньо інформативний гістохімічний реагент для дослідження якісної перебудови глікокон'югатів нирки як в умовах фізіологічної норми, так і при патології. Порівняння характеру зв'язування лектину CNFA з близькими до нього за вуглеводною специфічністю лектинами арахісу (PNA), сої (SBA) та виноградного слимака (HPA) виявило певні відмінності у зв'язуванні зі структурними компонентами нирки, що свідчить про унікальність лектину CNFA як гістохімічного реагента.

Ключові слова: нирка щура, постнатальний морфогенез, діабетична нефропатія, лектин CNFA

Робота є фрагментом НДР Лектино- та імуногістохімічний аналіз вуглеводних детермінант нормальних і патологічно змінених клітин і тканин» (№ державної реєстрації 0113U000207).

Вивчення можливостей використання в гістохімії лектинів рідкої та вузької вуглеводної специфічності продовжує залишатися актуальним напрямом морфологічної науки [5, 6, 9]. До вищезначеної категорії можна віднести лектин з плодових тіл гриба грузлика димчастого (*Clitocybe nebularis* Fr.), який виявляє вибіркочу специфічність до глікокон'югатів з вуглеводними детермінантами Gal β 1-4Glc та DGalNAc [1, 7]. А.М. Яценко і співавт.[4] було продемонстровано вибіркоче зв'язування лектину гриба *Clitocybe nebularis* (CNFA) з береговими макрофагами лімфатичних вузлів щура. Нещодавно показано, що CNFA може представляти певний інтерес для ранньої гістохімічної діагностики пухлинного переродження товстої кишки людини [2], однак публікацій з використанням означеного лектину для маркування гістологічних структур нирки у доступній літературі нами не виявлено.

Метою роботи було вивчення можливостей використання лектину CNFA для характеристики процесів морфогенезу та гістопатології нирки.

Матеріал та методи дослідження. У роботі були використані гістологічні проби нирки щурів лінії Вістар, які включали сім груп тварин: на 20-у, 60-у та 120-у добу постнатального онтогенезу, а також на 14-у, 30-у, 40-у та 80-у добу розвитку стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету. Детальніше умови постановки експерименту наведені у нашій попередній публікації [8]. Нирки забирали після усипання тварин під дією ефірного наркозу, розрізали в серединній площині, фіксували у 4% нейтральному формаліні з подальшою заливкою у парафін відповідно до стандартної методики. Всі маніпуляції проводилися відповідно до вимог Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, котрі використовуються для експериментів чи інших наукових цілей (Страсбург, 1986), а також загальних етичних принципів стосовно експериментальних тварин, затверджених на Першому українському конгресі з біоетики (Київ, 2001).

Для гістохімічного дослідження використано кон'югат лектину CNFA з пероксидазою хрому, люб'язно наданий д.фарм.наук, проф.В.О.Антонюком. Зрізи інкубували в розчині лектину в ЗФР рН 7,4 (концентрація 50 мкг/мл, час інкубації – 1 год.) з наступною візуалізацією місць його зв'язування діамінобензидину тетрагідрохлоридом (Sigma) як описано раніше [3]. Мікроскопію та фотографування препаратів здійснювали за допомогою мікроскопа Zeiss Ng (Carl Zeiss, Jena), обладнаного цифровою фотокамерою Canon IXUS 700 (Canon, Tokyo). Інтенсивність зв'язування оцінювалась двома незалежними спостерігачами з використанням напівкількісної шкали, де ++ значна реактивність, + позитивна реакція, - відсутність зв'язування.

Результати дослідження та їх обговорення. Реактивність структурних компонентів нирки з лектином CNFA представлена у Табл.1, а також на рис.1, 2. При цьому зауважимо, що згідно наших попередніх досліджень [8], нирка щура набуває дефінітивних ознак на 60-у

постнатальну добу, тому гістопроби цієї групи тварин були використані в якості контролю для порівняння з тканинами щурів з модельованою діабетичною нефропатією. Мікроскопія препаратів виявила інтенсивне маркування ниркових тілець (головним чином елементів фільтраційного бар'єру) на всіх етапах постнатального онтогенезу та розвитку діабету.

Таблиця 1

Динаміка зв'язування лектину CNFA зі структурними компонентами нирки щура у процесі морфогенезу органа та на тлі розвитку діабетичної нефропатії

Структури нирки	20 доба п/н	60 доба п/н	120 доба п/н	14 доба ц/д	30 доба ц/д	40 доба ц/д	80 доба ц/д
Ниркові тіліця	++	++	++	++	++	++	++
Проксимальні трубочки	+ л/п	++ щ/о	++ щ/о	++ щ/о	++ щ/о	+ ц/г	++ ц/г
Дистальні трубочки	-	+ л/п	+ л/п	+ ц/г	+ ц/г	+ ц/г	++ ц/г
Збірні ниркові протоки	-	++ л/п	++ л/п	+ ц/г	+ ц/г	+ ц/г	++ ц/г

Примітки: п/н постнатально; ц/д цукровий діабет; л/п люменальна поверхня; щ/о щіткова облямівка; ц/г цитоплазматичні глікополімери. Інтенсивність зв'язування лектину: ++ значна реактивність, + позитивна реакція, - реактивність відсутня

Динаміка реактивності люменальної поверхні проксимальних і дистальних трубочок нефронів упродовж постнатального онтогенезу і у процесі розвитку діабетичної нефропатії загалом носила взаємопротилежний характер. Так, реактивність проксимальних трубочок упродовж постнатального онтогенезу підвищувалась, концентруючись у складі щіткової облямівки (рис.1).

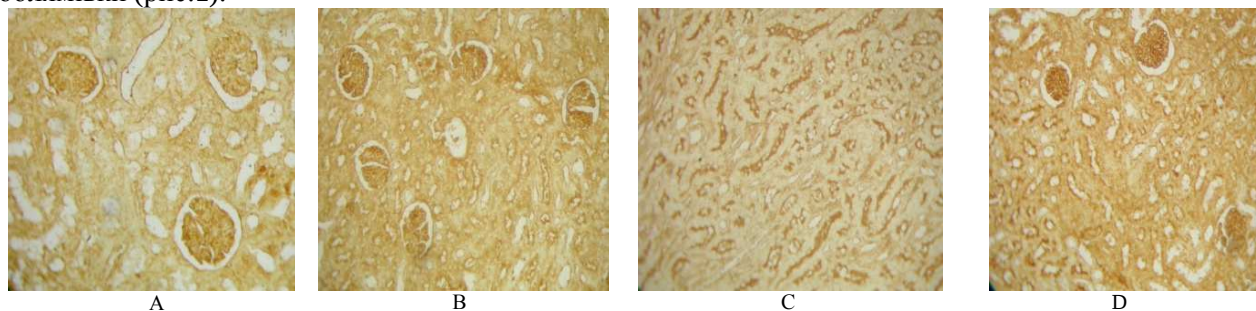


Рис.1. Характер перерозподілу рецепторів лектину CNFA упродовж постнатального морфогенезу нирки щура. А. 20-а доба: реактивність ниркових тілець та люменальної поверхні проксимальних трубочок, х400; В,С. 60-а доба: інтенсивне маркування ниркових тілець, щіткової облямівки проксимальних трубочок, люменальної поверхні дистальних трубочок та збірних ниркових проток, х200; D. 120-та доба: посилене експонування рецепторів лектину у складі ниркових тілець, щіткової облямівки та у цитоплазмі епітеліоцитів ниркових трубочок, х200.

По мірі прогресії нефропатії виявлена тенденція до редукції зв'язування лектину з окремими сегментами щіткової облямівки; при цьому ареактивні ділянки чергувалися з ділянками з інтенсивною реактивністю, що поєднувалося з підвищеним експонуванням рецепторів лектину у складі цитоплазматичних глікокон'югатів епітелію ниркових трубочок (рис.2).

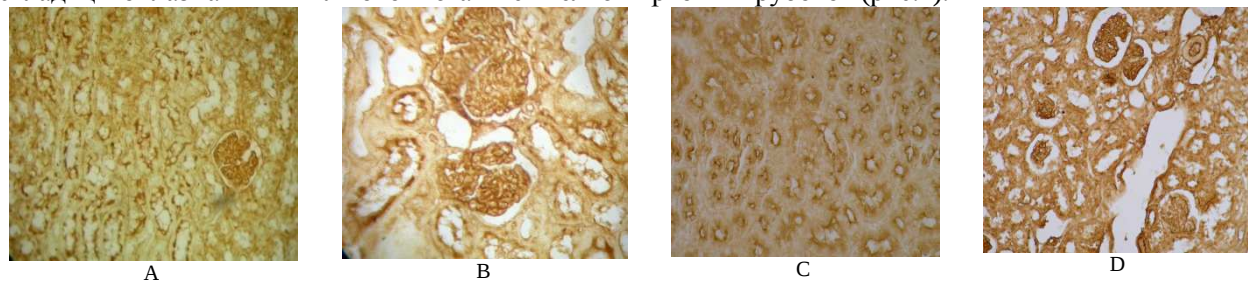


Рис.2. Гістотопографія рецепторів лектину CNFA у структурах нирки щура на тлі стрептозотозин-індукованого цукрового діабету (ц/д). А. 14-а доба ц/д: значна реактивність ниркового тіліця, гетерогенність зв'язування лектину зі щітковою облямівкою проксимальних трубочок (чергування лектин-позитивних та ареактивних ділянок), х200; В. 30-а доба ц/д: підвищене експонування рецепторів лектину у складі ниркових тілець, гетерогенна реактивність щіткової облямівки, х400. С. 40-а доба ц/д: накопичення рецепторів лектину у складі цитоплазматичних глікокон'югатів епітелію проксимальних трубочок та на люменальній поверхні збірних проток, х200. D. 80-а доба ц/д: посилення реактивності ниркових тілець, накопичення рецепторів лектину CNFA у цитоплазмі клітин ниркових трубочок у поєднанні з цілковитою редукцією реактивності щіткової облямівки, х200.

На 60-у та 120-у постнатальну добу рецептори лектину CNFA були виявлені на люменальній поверхні дистальних трубочок і збірних ниркових проток. Інтенсивність зв'язування лектину з цими структурами нирки частково редукувалася у ході прогресії діабетичного синдрому за рахунок зростання реактивності цитоплазматичних глікополімерів. Загалом діабет-індукована перебудова глікокон'югатів нирки супроводжувалась накопиченням рецепторів лектину CNFA

(термінальних залишків Gal β 1-4Glc та DGalNAc) у складі цитоплазми епітелію проксимальних і дистальних трубочок, збірних ниркових проток у поєднанні зі зменшенням реактивності їх люменальної поверхні.

Ми розцінюємо означену тенденцію як вияв порушень процесів кінцевого глікозилювання у комплексі Гольджі і затримку включення глікополімерів до апікальної плазмалеми, що, правдоподібно, негативно впливає на процеси реабсорбції у нирці. Порівняння реактивності лектину CNFA з близькими до нього за вуглеводною специфічністю лектинами арахісу (PNA), сої (SBA) та виноградної слимака (HPA) виявило певні відмінності у зв'язуванні зі структурними компонентами нирки [9], що свідчить про своєрідність цього гістохімічного реагента.

Висновок

Лектин CNFA може бути рекомендований в якості селективного гістохімічного маркера ниркових тілець та щіткової облямівки проксимальних трубочок нефронів щура, для морфометричних досліджень, а також в якості достатньо інформативного реагента для дослідження якісної перебудови глікокон'югатів нирки як в умовах фізіологічної норми, так і при патології. Нирка щура виявилась адекватним тест-об'єктом для апробації нових лектинів як гістохімічних реагентів.

Перспективи подальших досліджень. Порівняти гістотопографію рецепторів лектину CNFA в нирках людини і щура, а також характер їхнього перерозподілу при інших формах експериментальної та клінічної патології.

Список літератури

1. Antonyuk V.O. Lektini ta yih sirovinni dzherela / V.O. Antonyuk // Lviv: Kvart, - 2005.- S. 328-329.
2. Antonyuk R.V. lektinogistohimichne doslidzhennya tovtsoyi kishki lyudini v normi ta pri neplastichnih protsesah z vikoristannyam lektiniv, spetsifichnih do T-antigenu ta N-atsetilaktozaminu / R.V. Antonyuk, O.D. Lutsik // Svit meditsini ta biologiyi.-2015.-No. 2(49).-S.73-78.
3. Lutsik A.D. Lektinyi v gistohimii / A.D. Lutsik, E.S. Detyuk, M.D. Lutsik // Lviv: Vischa shkola, - 1979.-S.7-37.
4. Yaschenko A. M. Tsitotopografiya retseptoriv lektiniv u strukturnih komponentah organiv Immunogenezu / A.M. Yaschenko, V.O. Antonyuk, O.V. Nakonechna [ta In.] // - Lvivskiy medichniy chasopis.-2005.-T.9, No. 3.-S. 96-100.
5. Dan X. Development and applications of lectins as biological tools in biomedical research / X. Dan, W. Liu, T.B. Ng // Med.Res.Rev.-2015. P. 213-263.
6. Gabius H.J. The sugar code. Fundamentals of glycosciences / H.J.Gabius // Weinheim: Wiley, - 2009.-P. 317-328.
7. Horejsi V. Studies on lectins. XXXVI. Properties of some lectins prepared by affinity chromatography on O-glycosyl polyacrylamide gels / V. Horejsi, J. Kocourek // Biochim.Biophys.Acta.-1978.- Vol.538, № 2.-P.299-315.
8. Lutsyk A. Diabetic alteration versus postnatal maturation of rat kidney glycoconjugates – comparative detection by lectin probes/ A. Lutsyk, N. Ambarova, V. Antonyuk // Folia Histochem.Cytobiol.-2013.- Vol. № 1.-P.92-102.
9. Roth J. Lectins for histochemical demonstration of glycans/ J.Roth // Histochem.Cell Biol.-2011.-Vol.136.-P.117-130.

Реферати

ЛЕКТИН ГРИБА ГОВОРУШКИ ДЫМЧАСТОЙ (CLITOCYBE NEBULARIS FR.): НОВЫЙ ГИСТОХИМИЧЕСКИЙ РЕАГЕНТ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МОРФОГЕНЕЗА И ГИСТОПАТОЛОГИИ ПОЧКИ

Амбарова Н. А.

На примере постнатального морфогенеза почки крысы и экспериментальной модели диабетической нефропатии исследовано возможность использования лектина гриба говорушки дымчатой (CNFA) в качестве гистохимического реагента. Показано, что упомянутый лектин может быть использован в качестве селективного маркера почечных телец и щеточной каемки проксимальных трубочек нефронов, для морфометрических исследований, а также в качестве достаточно информативного гистохимического реагента в исследовании качественной перестройки гликоконъюгатов почки как в условиях физиологической нормы, так и при патологии. Сравнение характера связывания лектина CNFA с близкими ему по углеводной специфичности лектинами арахиса (PNA), сои (SBA) и виноградної улитки (HPA) позволило установить определенные различия в их связывании со структурными компонентами почки, что свидетельствует о своеобразии этого лектина как гистохимического реагента.

Ключевые слова: почка крысы, постнатальный морфогенез, диабетическая нефропатия, лектин CNFA.

Статья надійшла 5.01.2016 р.

LECTIN FROM CLITOCYBE NEBULARIS FUNGUS: A NEW HISTOCHEMICAL REAGENT FOR THE INVESTIGATION OF RENAL MORPHOGENESIS AND HISTOPATHOLOGY

Ambarova N. A.

Having used postnatal renal morphogenesis and experimental diabetic nephropathy as test-models in rats we investigated the prospective usefulness of Clitocybe nebularis fungus lectin (CNFA) for histochemical research. It was documented possibilities of this lectin application as a specific histochemical marker of renal corpuscles and of proximal tubules brush border, for morphometric studies, as well as reliable histochemical reagent for the investigation of qualitative rearrangement of renal glycoconjugates under physiological conditions and in histopathology research. Comparison of CNFA with lectins of similar carbohydrate specificities – peanut agglutinin (PNA), soybean agglutinin (SBA), Helix pomatia agglutinin (HPA) – demonstrated certain differences in labeling, encompassing unique histochemical properties of this lectin.

Key words: rat kidney, postnatal morphogenesis, diabetic nephropathy, lectin CNFA.

Рецензент Єрошенко Г.А.