

Н.О.Амбарова
О.Д.Луцик

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

Ключові слова: лектин гриба молочника пергаментного (LPFA), використання в гістохімії, ниркові тільця щура.

Надійшла: 30.11.2017
Прийнята: 18.12.2017

УДК 611.61-018:547.96]:616.379-008.64-092.9

СЕЛЕКТИВНЕ ГІСТОХІМІЧНЕ МАРКУВАННЯ СТРУКТУРНИХ КОМПОНЕНТІВ НИРКИ ЩУРА В НОРМІ ТА НА ТЛІ СТРЕПТОЗОТОЦИН-ІНДУКОВАНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ З ВИКОРИСТАННЯМ ЛЕКТИНУ ГРИБА МОЛОЧНИКА ПЕРГАМЕНТНОГО (*LACTARIUS PERGAMENUS FR.*)

Дослідження проведено в рамках науково-дослідної теми «Лектино- та імуногістохімічний аналіз вуглеводних детермінант нормальних та патологічно змінених клітин і тканин» (номер державної реєстрації 0117U001076).

Реферат. Вивчено взаємодію нового галактозоспецифічного лектину, очищеного з гриба молочника пергаментного (*Lactarius pergamenus Fr.*, LPFA), зі структурними компонентами нирки щура в нормі та при стрептозотоксин-індукованому цукровому діабеті. Встановлена здатність означеного лектину вибірково зв'язуватися з глікополімерами ниркових тілець, що дозволяє рекомендувати його для подальшого використання у морфологічних дослідженнях. Порівняння лектину LPFA з близькими до нього за вуглеводною специфічністю лектинами RCA та PNA виявило відмінності характеру зв'язування цих лектинів з нирковими структурами як тварин контрольної групи, так і після уведення стрептозотоксину, що свідчить про унікальність лектину LPFA як гістохімічного реагента. Рецептори означеного лектину демонстрували певну стійкість до порушень метаболізму, змінюючись у незначній мірі на тлі розвитку стрептозотоксин-індукованої діабетичної нефропатії, що може бути використано для оцінки глибини альтерації ниркових структур при патології.

Morphologia. – 2017. – Т. 11, № 4. – С. 23-27.

© Н.О.Амбарова, О.Д.Луцик, 2017

✉ lutsykalexander@gmail.com

Ambarova N.A., Lutsyk A.D. Selective histochemical labeling of normal rat kidney and that affected by streptozotocin-induced diabetes mellitus using lectin from *Lactarius pergamenus* fungus.

ABSTRACT. Background. Lectins due to the ability for specific recognition of cell and tissue glycoconjugates cover significant place in modern histochemistry. Nevertheless search for new lectins with rare and unique carbohydrate specificities remains actual. **Methods.** A newly purified galactose-specific lectin from *Lactarius pergamenus* fungus (LPFA) was applied to study micromorphology of normal rat kidney and that affected by streptozotocin-induced diabetes mellitus. **Results.** It was detected strong LPFA reactivity with renal corpuscles, less intensely were labeled brush border of renal tubules and plasma membranes of collecting ducts. Comparison of LPFA with closely related RCA and PNA lectins revealed certain differences in these lectins binding both in normal kidney, as well as with organ tissues of streptozotocin affected rats. LPFA receptors sites demonstrated certain stability with respect to streptozotocin-induced metabolic violations, this observation can be used for the estimation of kidney structure alterations severity under different forms of experimental and clinical pathology. **Conclusion.** These results demonstrate a rather unique carbohydrate specificity of LPFA lectin, which therefore can be recommended as a reliable reagent for further histochemical and histopathological investigations.

Key words: *Lactarius pergamenus* fungus agglutinin (LPFA), application in histochemistry, rat renal corpuscles.

Citation:

Ambarova NA, Lutsyk AD. [Selective histochemical labeling of normal rat kidney and that affected by streptozotocin-induced diabetes mellitus using lectin from *Lactarius pergamenus* fungus]. *Morphologia*. 2017;11(4):23-7. Ukrainian.

Вступ

Лектини завдяки унікальній здатності розпізнавати термінальні вуглеводні залишки гліко-

полімерів посідають вагоме місце серед сучасних методів гістохімії вуглеводів [1-5]. Не дивлячись на достатньо широкий спектр очищених і охарак-

теризованих препаратів лектинів, вивчення можливостей використання нових лектинів рідкої вуглеводної специфічності, зокрема, в якості селективних гістохімічних маркерів окремих типів і субпопуляцій клітин, тканинних екстрацелюлярних структур, продовжує залишатися актуальним напрямком морфологічної науки [6-10]. При цьому слід зазначити, що з огляду на простоту, доступність і вартість досліджень, методи лектинової гістохімії не лише успішно конкурують, але й мають ряд переваг над імуногістохімічними методами.

Нирки характеризуються значним різноманіттям структурних компонентів та присутніх у їхньому складі вуглеводних детермінант, у зв'язку із чим їх можна вважали достатньо адекватною тест-моделлю для апробації нових препаратів лектинів як з метою вибіркового виявлення органних структур, так і для дослідження перебудови глікорецепторів у фізіологічних умовах та при розвитку патології [11-13]. Нещодавно був опублікований спосіб очистки і охарактеризовано вуглеводну специфічність лектину з плодкових тіл гриба молочника пергаментного (*Lactarius pergamenus* Fr., LPFA) [14], однак можливість його застосування у морфології вивчені недостатньо.

Мета

На прикладі селективного гістохімічного виявлення структурних компонентів нирки щура в нормі та на тлі стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету дослідити придатність нового оригінального лектину, отриманого з плодкових тіл гриба молочника пергаментного (LPFA), для морфологічних досліджень.

Матеріали та методи

Дослід проводили на 7 статевозрілих щурах-самцях лінії Вістар масою 180-200 г, які були розділені на дві групи: перша – контрольна (3 щури), друга – дослідна (4 щури). Контрольна група тварин утримувалась у стандартних умовах віварію на збалансованому харчовому раціоні з вільним доступом до води. У щурів дослідної індукували розвиток діабетичної нефропатії шляхом однократного доочеревинного введення стрептозотоцину (Sigma, США) з розрахунку 70 мг/кг маси тіла тварини. Свідченням розвитку цукрового діабету був рівень глюкози в крові у межах 10-18 мМоль /л. Усі маніпуляції з тваринами проводили з дотриманням правил «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та наукових цілей» (Страсбург, 1986), та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 1759-VI від 15 грудня 2009 р.).

Нирки у щурів контрольної групи та на 30-й день розвитку цукрового діабету забирали після усипання тварин під дією ефірного наркозу, розрізали по серединній площині, фіксували у 4% нейтральному формаліні і заливали у парафін

згідно стандартної методики. Зрізи товщиною 5-7 μм депарафінували і обробляли лектином LPFA, який проявляє найвищу афінність до олігосахаридів складної структури з термінальними залишками DGal(β1-3)DGlcNAc [14]. Характер зв'язування означеного лектину зі структурами нирки порівнювали з близькими до нього за вуглеводною специфічністю лектинами арахісу (PNA) та рицини (RCA). Кон'югати лектинів LPFA, PNA та RCA з пероксидазою хрому було люб'язно надано д.фарм.н., проф.В.Антонюком. Візуалізацію місць зв'язування лектинів проводили діамінобензидину тетрагідрохлоридом (Sigma, США) в присутності H₂O₂ як описано раніше [1, 12].

Мікроскопію та фотографування препаратів здійснювали з використанням мікроскопа «Granum R6053», обладнаним фотокамерою «Echoo-Imager 502000», та комп'ютерної програми «ToupView 3.7».

Результати та їх обговорення

В кірковій речовині нирок щурів як контрольної, так і дослідної груп, лектин LPFA селективно взаємодіяв з глікополімерами у складі ниркових тілець (рис. 1). У мозковій речовині значну реактивність з лектином демонструвала щіточкова облямівка частини ниркових трубочок; інтенсивність взаємодії дещо підвищувалась на тлі діабетичної нефропатії (рис. 2А, В). У складі сосочкової частини нирки лектин LPFA взаємодіяв зі стромальними компонентами, апікальною і базальною поверхнею клітин збірних ниркових проток та тонких трубочок петлі Генле; реактивність означених структур на тлі діабетичної нефропатії була підвищеною у порівнянні з контролем (рис. 2С, D). Разом із тим слід зазначити, що перерозподіл LPFA-специфічних глікокон'югатів на тлі цукрового діабету був виражений у меншій мірі, аніж задокументований нами раніше перерозподіл у складі ниркових структур рецепторів лектинів Con A, LABA, SNA, PNA [11, 12].

Лектин RCA в контрольних зразках демонстрував подібну до LPFA підвищену спорідненість з нирковими тільцями, тоді як реактивність щіточкової облямівки і люменальної поверхні збірних ниркових проток дещо перевищувала аналогічні показники для LPFA. Ін'єкція стрептозотоцину обумовлювала істотне зниження реактивності ниркових тілець у поєднанні з дещо менш вираженою редукцією зафарбовування щіточкової облямівки і збірних ниркових проток з лектином RCA. Лектин PNA відносно слабо реагував зі структурними компонентами нирки тварин контрольної групи, у той час як на тлі діабетичної нефропатії реактивність ниркових трубочок, особливо люменальної поверхні збірних ниркових проток з цим лектином істотно підвищувалась.

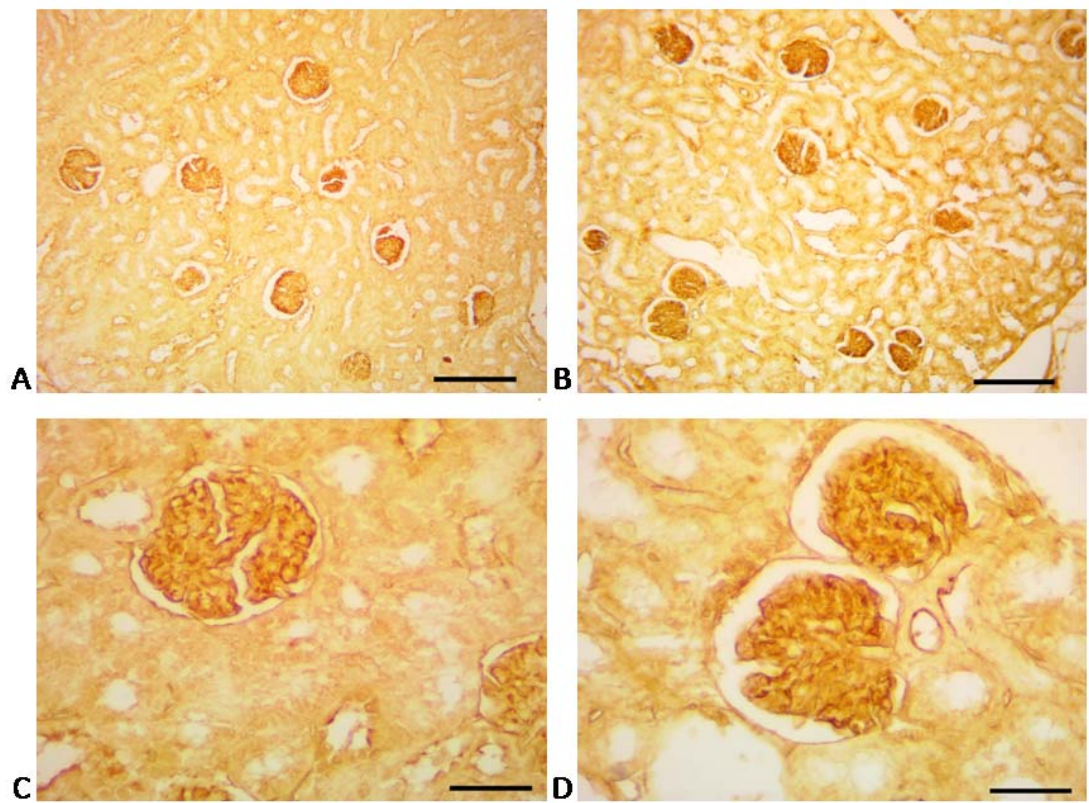


Рис. 1. Селективне виявлення ниркових тілець щура з використанням лектину LPFA. А, С – нирка інтактного щура, $\times 100$ (А) і $\times 400$ (С); В, D – нирка щура на 30 добу після ін'єкції стрептозотозину, $\times 100$ (В) і $\times 400$ (D). Масштабні відрізки 200 μm (А, В) та 50 μm (С, D).

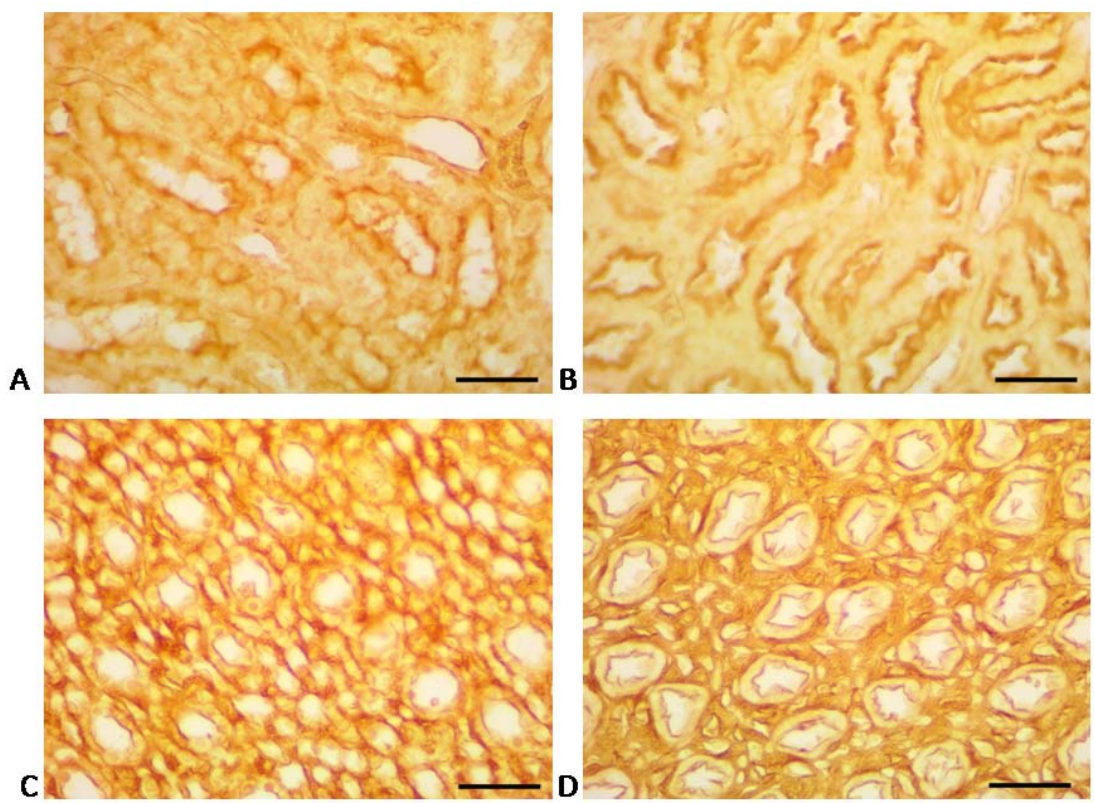


Рис. 2. Маркування лектином LPFA щіткової облямівки ниркових трубочок інтактного (А) та дослідного (В) щура; реактивність лектину LPFA з люменальною і базальною плазмалемою збірних проток, тонких сегментів петлі Генле та інтерстиційною сполучною тканиною нирки контрольного (С) та дослідного (D) щура. $\times 400$, масштабні відрізки 50 μm .

Закономірності взаємодії ниркових структур з лектинами рицини і арахісу корелювали з описаними раніше [12], але дещо відрізнялися від реактивності з лектином гриба молочника пергаментного, що, правдоподібно, обумовлено певними відмінностями у структурі олігосахаридних ланцюгів, що служать рецепторами означених лектинів (ступінь розгалуженості, заряд, конфігурація молекули, вплив найближчих моносахаридних залишків тощо). При цьому варто зауважити, що у наших попередніх дослідженнях [11, 12] було виявлено високий вміст у складі ниркових тілець і щіточкової облямівки ниркових трубочок щура високий вміст вуглеводних детермінант DMan, LFuc, NeuNAc, DGlcNAc у поєднанні з незначним вмістом DGal та DGalNAc. Описані вище результати розширяють і доповнюють ці спостереження.

Висновки

1. Лектин LPFA виявився селективним гістохімічним маркером ниркових тілець щура, що дозволяє рекомендувати його для подальшого

використання у морфологічних дослідженнях, а також для виготовлення навчальних гістологічних препаратів.

2. Характер зв'язування лектинів LPFA, RCA та PNA з нирковими структурами як тварин контрольної групи, так і закономірності перерозподілу рецепторів означених лектинів після уведення стрептозоточину відрізнялися.

3. Рецептори лектину LPFA виявили певну стійкість до порушень метаболізму, змінюючись у незначній мірі на тлі розвитку стрептозоточин-індукованої діабетичної нефропатії, що може бути використано для оцінки глибини альтерації ниркових структур при патології.

Перспективи подальших досліджень

Проаналізувати вплив блокування глікоцепторів нирки D-галактозою, нативними лектинами RCA та PNA, а також попередньої обробки зрізів нейрамінідазою, з метою дослідження афінності та конкуренції лектинів за ідентичні вуглеводні детермінанти. Випробувати реактивність лектину LPFA з іншими морфологічними об'єктами – яєчниками, яєчками тощо.

Літературні джерела References

1. Lutsyk AD, Detiuk ES, Lutsik MD. [Lectins in histochemistry]. Lviv: Vyshcha shkola; 1989. 144 p. Russian.
2. Antonyuk VO. [Lectins and their sources]. Lviv: Kvant; 2005. 554 p. Ukrainian.
3. Sharon N, Lis H. Lectins. 2nd ed. Dordrecht: Springer; 2007. 464 p.
4. Gabius HJ, editor. The sugar code. Fundamentals of glycoscience. Weinheim: Wiley; 2009. 328 p.
5. Varki A, Cummings RD, Esko JD. Essentials of glycobiology. 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. 482 p.
6. Lutsyk AD. [Lectins as selective histochemical markers of different cell types and their subpopulations, extracellular tissue structures]. Archiv Anatomii, Gistologii i Embriologii. 1988;95(11):83-104. Russian.
7. Smolkova O, Zavadka A, Bankston P, Lutsyk A. Cellular heterogeneity of rat vascular endothelium as detected by HPA and GS-I lectin-gold probes. Medical Science Monitor. 2001;7(4):659-68.
8. Brooks SA, Dwek MV, Shumacher U. Functional and molecular glycobiology. Oxford:

Bios Scientific Publishers; 2002. 268 p.

9. Roth J. Lectins for histochemical demonstration of glycans. Histochem Cell Biol. 2011;136(2):117-30.

10. Hirabayashi J, editor. Lectins. Methods and protocols. New York: Springer; 2014. 614 p.

11. Ambarova N. [Rearrangement of rat kidney sialoglycans during postnatal morphogenesis and in streptozotocin-induced diabetic nephropathy]. Morphologia. 2009;3(3):21-31. Ukrainian.

12. Lutsyk A, Ambarova N, Antonyuk V. Diabetic alteration versus postnatal maturation of rat kidney glycoconjugates – comparative detection by lectin probes. Folia Histochem Cytobiol. 2013;51(1):92-102.

13. Ambarova NA. [Lectin from Clitocybe nebularis fungus: a new histochemical reagent for the investigation of renal morphogenesis and histopathology]. Svit Medytsyny ta Biologii. 2016;12(1):119-21. Ukrainian.

14. Panchak LV, Antonyuk VA. [Purification of lectin from fruiting bodies of *Lactarius pergamenus* (Fr.)Fr. and investigation of its characteristics]. Biochimii. 2011;76(4):537-50. Russian.

Амбарова Н.А., Луцик А.Д. Селективное гистохимическое маркирование структурных компонентов почек крыс в норме и на фоне стрептозоточин-индуцированного сахарного диабета с использованием лектина гриба молочника пергаментного (*Lactarius pergamenus* Fr.).

Реферат. Изучено взаимодействие нового галактозоспецифичного лектина, очищенного из гриба молочника пергаментного (*Lactarius pergamenus* Fr., LPFA), со структурными компонентами почек крыс

в норме и на фоне развития стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета. Установлена способность лектина LPFA избирательно связываться с гликоконъюгатами почечных телец, что позволяет рекомендовать его для дальнейшего использования в морфологических исследованиях. Сравнение лектина LPFA с близкими по углеводной специфичности лектинами клещевины (RCA) и арахиса (PNA) выявило отличия характера связывания указанных лектинов с почечными структурами как животных контрольной группы, так и после введения стрептозотоцина, что свидетельствует об уникальности лектина LPFA как гистохимического реагента. Рецепторы лектина LPFA демонстрировали определенную стойкость к нарушениям метаболизма, подвергаясь незначительным изменениям на фоне развития стрептозотоцин-индуцированной диабетической нефропатии, что может быть использовано для оценки глубины альтерации почечных структур при патологии.

Ключевые слова: лектин гриба молочника пергаментного (LPFA), использование в гистохимии, почечные тельца крысы.