

УДК - 591.461.2.:577.811):616-092.9

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРНЫХ И ЦИТОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПОЧЕК КРЫСЯТ-САМЦОВ В РАЗЛИЧНЫЕ ПЕРИОДЫ ПОСТНАТАЛЬНОГО ОНТОГЕНЕЗА

Е. Ч. Михальчук, Я. Р. Мацюк

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

Морфофункциональными методами исследования установлено, что наиболее интенсивный рост почек крысят происходит в период с 45-ых по 90-ые сутки постнатального развития, что подтверждается прогрессивным увеличением массы почек, ширины коркового вещества, а также возрастанием морфометрических показателей структур нефронов. Это обусловлено сменой типа питания, увеличением количества принимаемой пищи и массы тела, что приводит к возрастающей функциональной нагрузке на почки. Последнее подтверждается прогрессивным увеличением активности оксидоредуктаз (СДГ, ЛДГ, Г-6ф ДГ) и фосфатаз, особенно в эпителиоцитах канальцев почки. Это дает возможность обеспечить не только энергетический потенциал структур нефрона, но и снабжает их необходимым пластическим материалом для проведения внутриклеточных процессов регенерации и адаптации.

Ключевые слова: почка, нефрон, проксимальные и дистальные отделы, почечное тельце, ферменты, гликопротеины, гликозаминогликаны.

Morphofunctional investigation has shown that the most intensive renal growth in rats occurs at the age of 45-90 days. This is confirmed by progressing increase of renal mass and width of cortical substance as well as by higher morphometric indices of nephron structures. Such processes are induced by the change in feeding type, higher amount of food consumed and higher body weight, all these factors increasing the functional renal load. This conclusion is supported by progressing increase in oxidoreductase (succinate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, glucoso-6-phosphate dehydrogenase) and phosphatase activities in renal tubular epithelial cells. Such increase both provides the energetic potential of nephron structures and supplies the necessary plastic material for intracellular regenerative and adaptive processes in these structures.

Key words: kidney, nephron, proximal and distal segments, renal body, enzymes, glycoproteins, glycosaminoglycans.

В морфологическом отношении почка новорожденного крысенка соответствует почке тех млекопитающих и человека, у которых процесс образования нефронов заканчивается к моменту рождения [2]. Сопоставление структур почек у представителей различных классов позвоночных в процессе онтогенеза указывает на то, что их прогрессивное развитие соответствует возрастающей роли почки как органа гомеостаза [4]. Детальным анализом данных литературы за последние годы установлено, что основное внимание уделялось структуре почек новорожденных. Сведения о возрастных структурных особенностях почек и их нефронов немногочисленны и не лишены противоречий. Практически отсутствуют данные об ультраструктурных особенностях эпителиоцитов различных отделов нефронов и их возрастных цитохимических свойствах. Не выявлены и половые различия структурно-цитохимических свойств разных отделов нефронов, несмотря на то, что заболевания почек у лиц мужского пола, как показали клинические наблюдения, встречаются чаще, нежели у женского [7]. К этому причастны генетические и гормональные факторы. Опосредованные

через рецепторы половых гормонов механизмы, изменяющие гломерулярную гемодинамику, пролиферацию мезангиальных клеток, синтез и выделение цитокинов, вазоактивных веществ и факторов роста, вероятно, и формируют половые особенности заболеваний почек [8]. Исходя из вышеизложенного, нами была поставлена цель - установить в эксперименте особенности структурных и цитохимических свойств почек крысят-самцов в различные периоды постнатального развития.

Материал и методы исследования

Эксперимент проводился на беспородных белых крысах (26 самок) и полученном от них потомстве (93 крысенка мужского пола), находившихся на стандартном рационе вивария [5]. Первым днем беременности считался день обнаружения сперматозоидов во влажных мазках. На 15-ые (ранний постнатальный период), 45-ые (пубертатный период) и 90-ые (половозрелый период) сутки после рождения крысята-самцы взвешивались и подвергались эвтаназии парами эфира с последующей декапитацией. Быстро извлекались почки, взвешивались, и сразу же забирался материал для гистологических, электронно-микроскопических

МИХАЛЬЧУК Елена Чеславовна - ассистент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии УО «ГГМУ», р.т. 44-26-68, e-mail: milena6519;

МАЦЮК Ярослав Романович - профессор кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии УО «ГГМУ»

ких и гистохимических исследований. Определялся соматический коэффициент почек. Для получения объективных данных о структурных изменениях в нефронах развивающихся почек животных проводился тщательный морфометрический анализ гистологических препаратов с применением компьютерной системы анализа изображений «Bioscan». На поперечных срединных срезах почек измеряли ширину зоны коркового вещества, определяли численную плотность почечных телец (ПТ) корковых и юкстамедуллярных нефронов, число их деструктивно измененных форм ($\times 200$). Измеряли минимальный и максимальный диаметр почечных телец, сосудистых клубочков, определяли объем полости капсулы в почечных тельцах корковых и юкстамедуллярных нефронов, диаметр извитых канальцев проксимальных и дистальных отделов, высоту выстилающих их эпителиоцитов и диаметр ядер последних ($\times 400$). Параллельно определяли относительные объемы почечных телец и сосудистых клубочков по формуле $V = \pi/6 (LB)^{3/2}$, где L – большой, а B – малый диаметры [1], относительные объемы ядер эпителиоцитов в канальцах – по формуле W.Jacobi (1925) для шаровидных ядер $V_{я} = \pi D^3/6$, где D – диаметр ядра эпителиоцита [1]. На гистологических препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, при увеличении $\times 1000$ определяли митотический индекс (МИ) среди эпителиоцитов проксимальных и дистальных отделов нефронов. Последний выражали в промилле (‰). В каждом препарате просматривали не менее 12000 клеток. Для электронно-микроскопических исследований материал почек фиксировали в 1% растворе четырехоксида осмия на 0,1M буфере Миллонига, дегидратировали в спиртах восходящей концентрации и ацетоне, заливали в смеси эпона и аралдита по Н. Mollenhauer (1964). Срезы изготавливали на ультрамикротоме МТ-7000 и контрастировали с применением метода двойного окрашивания уранилацетатом и цитратом свинца по E.S.Reynolds (1963). В эпителиоцитах канальцев проксимальных и дистальных отделов нефронов цитофотометрическим методом, с использованием прибора МФТХ-2Н определяли количественную ферментативную активность оксидоредуктаз (СДГ, ЛДГ, Г-6ф ДГ) и фосфатаз (КФ, ЩФ) при установленной для каждого фермента длине волны – от 440 до 580 нм, а также содержание в них гликопротеинов и гликозаминогликанов [6]. Результаты количественных морфометрических и цитофотометрических исследований обрабатывались с помощью методов вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента на персональном компьютере с применением программы «Statistica 6.0» для «Windows». Различия двух сравниваемых величин считали достоверными при $p < 0,05$. Диаграммы выполнены с помощью программы «Excel».

Результаты исследования

Проведенные исследования показали, что по мере роста животных закономерно увеличивается абсолютная масса крысят и их почек при одновременном снижении соматического коэффициента органов. Последнее обусловлено более быстрым увеличением в постнатальном онтогенезе массы тела по сравнению с массой почек (табл. 1).

Таблица 1. Показатели абсолютной массы почек и их соматического коэффициента у крысят-самцов в различные периоды онтогенеза

Группы	Масса крысят (г)	Масса почек (г)	Соматический коэффициент
15 сутки	17,73 ± 0,51	0,196 ± 0,003	1,087 ± 0,014
45 сутки	58,00 ± 1,34*	0,586 ± 0,007*	1,021 ± 0,017*
90 сутки	144,17 ± 2,59*	1,125 ± 0,003*	0,782 ± 0,012*

Примечание: * - показатели достоверны по сравнению с таковыми у 15-суточных животных ($p < 0,001$).

Морфометрическим анализом гистологических препаратов, изготовленных из поперечных срединных срезов почек, установлено достоверное увеличение ширины коркового вещества на поперечных срединных срезах органа по мере роста животного. Последнее наиболее выражено в период с 45-х по 90-е сутки, нежели с 15-по 45-е (рис. 1).

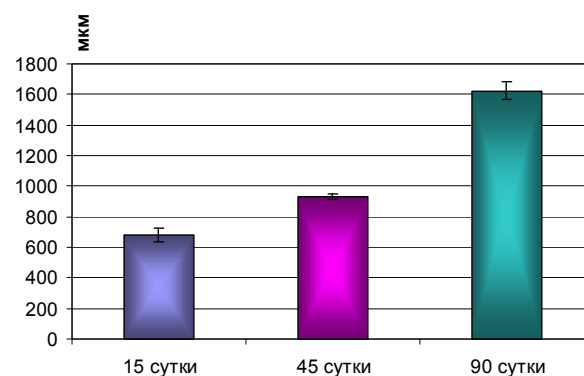


Рис. 1. Ширина коркового вещества почек крысят-самцов в различные сроки постнатального развития

Выявлено, что уже на 15-е сутки постнатального развития структура почек крысят в основном сформирована. На поперечных срединных срезах органа отчетливо выделялось более темное корковое и более светлое мозговое вещество. Определялись все типы почечных телец (ПТ) – более крупные – юкстамедуллярных нефронов, меньших размеров – корковых и самые маленькие, пока еще не достигшие полного развития, – субкапсулярных. Последнее связано с тем, что субкапсулярные нефроны в процессе онтогенеза появляются позже остальных и в данном возрастном периоде являются еще физиологически незрелыми. Численная плотность почечных телец, как корковых, так и юкстамедуллярных нефронов, на единицу площади среза с возрастом животных постепенно снижалась, а их объемные показатели закономерно увеличивались (табл. 2).

Процент деструктивно-измененных форм по-

Таблица 2. Морфометрические показатели почечных телец (ПТ) почек крысят-самцов в различные сроки после рождения

Показатели	15-е сутки	45-е сутки	90-е сутки
Количество ПТ корковых нефронов в поле зрения	12,24±0,44	9,32±0,26*	8,73±0,27*
Количество ПТ юкстамедуллярных нефронов в поле зрения	3,76±0,31	2,16±0,16	1,40±0,53
Процент деструктивно измененных ПТ корковых нефронов	6,87±0,54	9,32±0,53	6,79±1,53
Объем ПТ корковых нефронов (мкм ³)	34988,46±2246,23	86843,20±9005,44*	171289,21±10085,67*
Объем сосудистых клубочков ПТ корковых нефронов (мкм ³)	24267,39±441,85	58759,20±6765,02*	96957,12±21879,72*
Объем полости капсулы КН (мкм ³)	10721,07±1943,26	28084,00±5188,65*	74332,09±4815,06*
Объем ПТ юкстамедуллярных нефронов (мкм ³)	76497,86±3811,78	144226,03±8397,92*	269662,20±9250,69*

Примечание: * - показатели достоверны по сравнению с таковыми у 15-суточных животных (p<0,05).

почечных телец (запустевающие ПТ, фрагментирующиеся сосудистые клубочки, разрушение их структурных компонентов) несколько увеличивался к 45-ым суткам (возможно, в связи с повышенной функциональной нагрузкой на почки в результате смены типа питания), а к 90-ым суткам этот показатель нормализовался (табл. 2).

Канальцевые структуры нефронов у 15-суточных животных также сформированы. По мере роста наблюдалось лишь увеличение их морфометрических параметров (диаметров канальцев, высоты выстилающих эпителиоцитов, объемов ядер последних), причем в проксимальных отделах нефронов эти изменения выражены в большей степени, нежели в дистальных. Вероятнее всего, это связано с более значительной функциональной нагрузкой первых, нежели вторых (табл. 3, рис. 2).

Электронно-микроскопические исследования

Таблица 3. Показатели канальцевых структур нефронов почек животных в различные периоды постнатального развития по данным морфометрии

Показатели	15-е сутки	45-е сутки	90-е сутки
Диаметр извитых канальцев проксимальных отделов (мкм)	16,47±0,70	25,98±0,44*	26,41±0,89*
Высота их эпителиоцитов (мкм)	6,03±0,24	8,50±0,23*	8,62±0,31*
Диаметр извитых канальцев дистальных отделов (мкм)	12,33±0,67	17,0±0,99*	18,71±1,04*
Высота их эпителиоцитов (мкм)	4,79±0,16	4,89±0,23	5,62±0,08

Примечание: * - различия достоверны по сравнению с таковыми у 15-суточных животных (p<0,05).

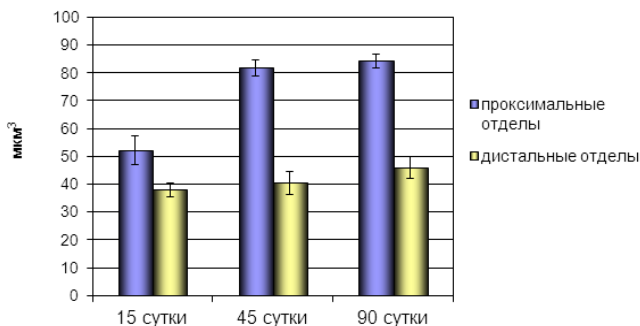


Рис. 2. Показатели объемов ядер эпителиоцитов канальцев проксимальных и дистальных отделов нефронов почек крысят-самцов в различные сроки постнатального развития

почек дали возможность установить некоторые отличия в строении эпителиоцитов проксимальных отделов нефронов животных различных возрастных групп. У 90-суточных крысят длина микроворсинок, образующих щеточную каемку на апикальном полюсе эпителиоцитов, была значительно выше, несмотря на то, что их диаметр оставался таким же, как и у 45-суточных. Микроворсинки располагались параллельными рядами, плотно примыкая друг к другу. Их плазмолемма снаружи покрыта гликокаликсом, имеющим мелкогранулярную структуру. Матрикс микроворсинок, за исключением некоторых, отличался средней электронной плотностью. В эпителиоцитах также возрастало количество везикулярных образований, первичных лизосом, фаголизосом и цитоплазматических телец с умеренно электронно-плотным содержанием. Многочисленные инвагинации плазмолеммы углублялись и расширялись. Усложнялись структуры базальной исчерченности. Между ее складками возрастало количество удлинённых митохондрий. Последние отличались обилием крист и высокой электронной плотностью матрикса. Обнаружена тесная связь складок плазматических мембран базальной исчерченности с крупными, богатыми кристами митохондриями. Исходя из данных литературы, это обусловлено повышенным транспортом ионов натрия и других веществ, осуществляемым против концентрационного и электрохимического градиента.

Проведенный цитофотометрический анализ гистохимических препаратов почек показал, что у 90-суточных крысят-самцов показатели активности изучаемых ферментов в структурах нефронов были более высокими, нежели у 15- и 45-суточных животных, особенно в эпителиоцитах проксимальных отделов нефронов и несколько ниже в их дистальных отделах (рис. 3, 4).

У 90-суточных животных активность щелочной фосфатазы была заметно выше, нежели в предыдущих возрастных группах. Фермент обнаруживался, в основном, в области щеточной каемки эпителиоцитов проксимальных отделов нефронов. В эпителиоцитах тонких канальцев, восходящих отделах петель Генле, как и в дистальных отделах, щелочная фосфатаза практически не выявлялась.

Содержание гликопротеинов в структурах почки по мере роста животных также возрастало, но локализация их сохранялась прежней. Гликопротеины обнаруживались в базальных мембранах гемокapилляров сосудистых клубочков почечных телец, в щеточной каемке и апикальной зоне эпителиоцитов проксимальных отделов нефронов, а также в окружающих их базальных мембранах. В базальных мембранах эпителиоцитов других отделов нефронов гликопротеины выявлялись в крайне малых количествах, в виде следов. Гликоген в

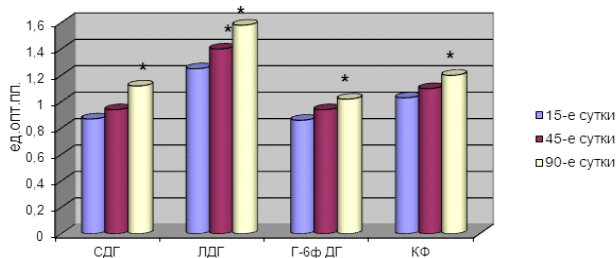


Рис. 3. Активность ферментов в эпителиоцитах проксимальных отделов нефронов почек развивающихся крысят-самцов по данным цитофотометрии.

Примечание: * - различия достоверны по сравнению с 15-суточными животными ($p < 0,001$)

эпителиоцитах нефронов гистохимически не обнаруживался.

На 90-ые сутки в почках половозрелых животных содержание сиаломуцинов в структурах коркового и мозгового вещества невысокое и почти такое же, как на 15-ые и 45-ые сутки постнатального развития. Они выявлялись лишь в базальных мембранах гемокапилляров сосудистых клубочков и, в меньшей степени, в базальных мембранах эпителиоцитов проксимальных и дистальных отделов нефрона.

Сульфомуцины у животных всех возрастных групп определялись в виде следов во всех отделах нефрона.

Анализ полученных данных дает возможность сделать вывод, что, в целом, наиболее интенсивно рост почек происходит в период с 45-ых по 90-ые сутки постнатального развития, нежели с 15-ых по 45-ые сутки. Об этом свидетельствует более наглядное увеличение массы почек, ширины их коркового вещества, увеличение морфометрических показателей структур почечных телец, хотя их численная плотность на единицу площади и снижается. Последнее связано с тем, что рост почек обусловлен уже не образованием новых нефронов, а продолжающейся дифференцировкой их структурных компонентов, как клубочкового, так и канальцевого аппарата. Надо полагать, что рост почки продолжается также за счет увеличения длины извитых канальцев и ткани интерстиция. Подтверждением этого является увеличение числа поперечно срезанных канальцев вокруг почечных телец. Сопоставление в диаграммах активности изучаемых ферментов в эпителиоцитах проксимальных и дистальных отделов нефронов в различные возрастные периоды дало возможность установить, что по мере роста животных усложнение структур нефронов происходит параллельно с прогрессирующим увеличением активности ферментов. Это обусловлено сменой типа питания (с молочного вскармливания на самостоятельное), происходящей на 20-ые – 22-ые сутки постнатального развития, увеличением с возрастом массы тела и количества принимаемой пищи, приводящее к возрастанию функциональной нагрузки на почки. Последнее тре-

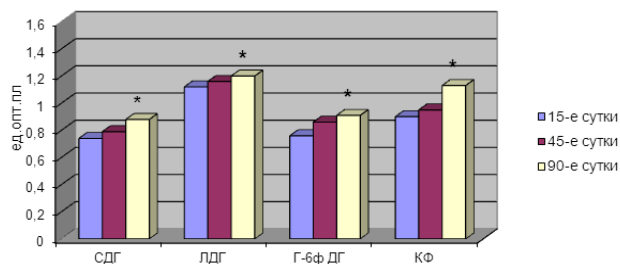


Рис. 4. Активность ферментов в эпителиоцитах дистальных отделов нефронов почек развивающихся крысят-самцов по данным цитофотометрии

бует не только энергетических затрат структур нефронов, а также внутриклеточной перестройки их эпителиоцитов. Об этом свидетельствует повышение в эпителиоцитах активности ферментов цикла Кребса и гликолиза (соответственно СДГ и ЛДГ), пентозофосфатного шунта – Г-6ф ДГ, связанной с синтезом пептоз, а также увеличение активности лизосомального фермента – кислой фосфатазы. По нашему мнению, последнее обусловлено компенсаторной внутриклеточной перестройкой эпителиоцитов в ответ на все возрастающую функциональную активность последних.

Литература

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. – М., Медицина 1990. – 285 с.
2. Богомолова Н.А. Возрастные изменения почки белой крысы // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. - 1965. - Т. XLVIII, Вып. 4. - С. 80-85.
3. Длюга Г., Кршечек И., Наточин Ю. Онтогенез почки. – Л.: Наука, 1981. - 184 с.
4. Наточин Ю.В. Основы физиологии почки. – Л.: Медицина, 1982. - 208 с.
5. Лоскутова З.Ф. Виварий. – М.: Медицина, 1980. – 94 с.
6. Пирс Э. Теоретическая и прикладная гистохимия. – М.: Иностранная литература, 1962. – 962 с.
7. Jovanovic Dijjona B., Djukanovic Ljubica. Analysis of factors influencing chronic renal failure progression // Renal Failure. - 1999. - Vol. 21, №2. - P.177-187.
8. Silbiger S., Neugarten J. The impact of gender on the progression of chronic renal disease // Am. J. Kidney Dis. - 1995. - Vol. 25, № 4. – P. 515-533.

Resume

THE SPECIFIC STRUCTURAL AND CYTOCHEMICAL PROPERTIES OF KIDNEYS IN MALE RATS DURING THE DIFFERENT PERIODS OF POSTNATAL ONTOGENESIS

E.Ch. Mikhalechuk, Ya.R. Matsiuk
Grodno State Medical University

The most intensive renal growth in rats occurs at the age from 45 to 90 days. This is confirmed by progressive increase of renal mass and width of cortical substance and by higher morphometric indices of nephron structures. Such processes are induced by the changes in feeding type, higher amount of food consumed and higher body weight, all these increase the functional renal load. The dynamic increase in oxidoreductase (succinate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, glucoso-6-phosphate dehydrogenase) and phosphatase activities in renal tubular epithelial cells both provides the energetic potential of nephron structures and supplies the necessary plastic material for intracellular regenerative and adaptive processes