

УДК: 611.33.018.72:618.3 – 06:616.36 – 008.811.6] – 092.9

СТРУКТУРНЫЕ И ЦИТОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭКЗОКРИНОЦИТОВ СОБСТВЕННЫХ ЖЕЛЕЗ ЖЕЛУДКА 15-СУТОЧНЫХ КРЫСЯТ, РОДИВШИХСЯ В УСЛОВИЯХ ХОЛЕСТАЗА БЕРЕМЕННЫХ, ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ВЫЗВАННОГО В ПЕРИОД ЭМБРИОГЕНЕЗА

Я.Р. Мацюк¹, А.А. Карчевский²¹ УО «Гродненский государственный медицинский университет»² Филиал УЗ «ГЦГП» Детская поликлиника № 1»

Гистологическими и гистохимическими методами с последующим морфометрическим, цитофотометрическим и статистическим анализом установлено, что подпеченочный обтурационный холестаз, вызванный на 12-е сутки беременности беспородных белых крыс, вызывает у родившегося потомства и достигшего 15-суточного возраста задержку развития слизистой желудка и его собственных желез. У последних снижено число экзокриноцитов, изменен их состав - количество главных, париетальных и мукоцитов уменьшено, а шеечных, наоборот - увеличено. Активность в экзокриноцитах СДГ, ЛДГ, НАД ДГ снижена, что тормозит в слизи продуцирующих клетках синтез гликопротеинов, гликозаминогликанов и уменьшению их содержания в поверхностной слизи. Активность КФ, наоборот, увеличена, что обусловлено развитием в экзокриноцитах деструктивных процессов.

Ключевые слова: холестаз, эмбриогенез, собственные железы желудка.

Histological and histochemical methods with the following morphometric, cytophotometric and statistical analysis revealed that the subhepatic obturational cholestasis induced in mongrel white rats on the 12th day of pregnancy caused the slowed development of gastric mucosa and intrinsic gastric glands in their newborn and 15-day pups. In the intrinsic glands the exocrinocyte number was low, and the exocrinocyte distribution was changed: lower fraction of main, parietal and mucoid cells, and larger fraction of the neck-form cells. Exocrinocyte activity of succinate dehydrogenase, lactate dehydrogenase and NADH dehydrogenase were lowered, thereby inhibiting the glycoprotein and glycosaminoglycan synthesis in mucus-producing cells and decreasing the contents of these molecules in the surface mucus. Inversely, acid phosphate activity was increased due to the development of destructive processes in exocrinocytes.

Keywords: cholestasis, embryogenesis, intrinsic gastric glands.

Аналитический обзор

По данным литературы число беременных, больных холециститом, желчнокаменной болезнью, сопровождающуюся частую холестазом, намного превышает число больных этой же группы, страдающих пороками сердца, гипертонической болезнью и другими заболеваниями [11, 12]. Нарушение оттока желчи из внутрипеченочных желчных ходов сопровождается билирубинемией, повышением в сыворотке крови уровня холестерина и резким увеличением концентрации желчных кислот (в 10-100 раз) [14, 19]. В эксперименте установлено, что уже на 15-е сутки обтурации желчного протока развивается цирроз печени, накапливаются продукты перекисного окисления липидов [18, 22].

Нужно отметить, что желчные кислоты являются единственными специфическими компонентами желчи. Последним приписывают роль поверхностно-активных веществ [4]. Они, благодаря высокой мобильной способности встраиваться в липидный комплекс мембран, играют роль их стабилизатора, оказывают существенное влияние на течение мембранных процессов, функцию клеток и органов в целом.

В работах Я.В. Ганиткевича [7], позже А. А. Туревского и его соотрудников [13], Я. Р. Мацюка

[9] и Л. С. Кизюкевича [8] установлено, что нарушение во взрослом организме энтерогепатической циркуляции (ахолия, холестаз) сопровождается выраженными структурными и метаболическими изменениями в большинстве его паренхиматозных органов.

При беременности, осложненной во втором триместре задержкой оттока желчи, отмечено достоверное уменьшение трансплацентарного транспорта желчных кислот за счет снижения сродства переносчиков этих кислот в мембранах клеток трофобласта плаценты [21].

Одни авторы считают, что лечение холестаза беременных малоэффективно [14]. Последний носит временный характер, серьезной угрозы для матери не представляет и не является показанием для прерывания беременности ввиду благополучности ее исходов [15]. Другие авторы, наоборот, утверждают, что хронические заболевания печени являются одной из причин осложнения родов [2], оказывают резко отрицательное влияние на плод. У таких больных могут быть преждевременные роды [16], смерть плода [20], достигающая 4-13 % [17]. Клинико-статистический анализ течения беременности и родов у женщин с холестазом позволил А.А. Закревскому [17] выявить более вы-

сокую перинатальную смертность (40%), а обострение данного заболевания вызывает в 3 раза чаще осложнения беременности и родов. Аналогичного мнения придерживается Zhigizo Tau [23].

Сведения о влиянии данной патологии беременных (холестаза) на рост и развитие потомства единичны. А. Н. Дахно в своих исследованиях отмечает это воздействие, как неблагоприятный момент [6]. У детей, родившихся от таких матерей, наблюдаются заболевания органов дыхания, желудочно-кишечного тракта [7], нарушения в развитии яичников [3], снижение слуха, отставание в физическом развитии [5].

Экспериментальные исследования Р. Н. Грицюка [5] с перевязкой общего желчного протока до наступления беременности и продолжающейся в течение ее приводили к нарушению обмена веществ, что может быть причиной внутриутробной гибели эмбрионов и плодов. Снижен у них диапазон и адаптивных реакций.

Воздействие же холестаза матери, возникшего при беременности в период эмбриогенеза, на развитие у потомства в постнатальный период органов пищеварительной системы не изучено.

Таким образом, изменения в организме потомства, родившегося от матерей с нарушенной энтерогепатической циркуляцией желчи, являются мало изученными, а имеющиеся данные противоречивы. Неуклонный рост, начиная с 40-х годов прошлого столетия, заболеваний печени, особенно желчнокаменной болезнью, приводящей зачастую к развитию холестаза, делает эту проблему **актуальной, социально значимой и важной** не только в **практическом**, но и **теоретическом** отношении [11, 12]. В связи с вышеизложенным принято исследование, **целью** которого было установить особенности воздействия холестаза беременных, экспериментально вызванного в период обособления у эмбрионов зачатков органов (10-12-е сутки беременности), на развитие в желудке собственных желез и становление морфофункциональных свойств их экзокриноцитов.

Материал и методы

Исследования проведены на 15 крысятах 15-суточного возраста. Из них 9 крысят родились от самок, которым на 12-е сутки беременности вызывали экспериментальный обтурационный холестаз. Последний заключался в наложении под общим наркозом лигатуры на верхнюю треть общего желчного протока. Остальные 6 крысят служили контролем. Они родились от самок, которым производились те же операционные вмешательства (наркоз, лапаротомия), но без наложения лигатуры на общий желчный проток. Опытные и контрольные самки и родившееся от них потомство находились под тщательным наблюдением: оценивались течение беременности, плодовитость и физическое развитие родившегося потомства.

На 15-е сутки после рождения опытных и контрольных крысят умерщвляли в парах эфира и быстро извлекали желудок. Строго с одного участка

донного отдела вырезали два кусочка. Один из них подвергался фиксации в жидкости Карнуа с последующим заключением в парафин. Изготовленные парафиновые срезы толщиной 5-6 мкм окрашивали гематоксилином и эозином и использовали для гистологических и морфометрических исследований с целью определения толщины слизистой оболочки, глубины желудочных ямок, длины собственных желез и качественного их состава – количества эшечных, главных, париетальных и добавочных экзокриноцитов. На парафиновых срезах толщиной 10 мкм определяли гистохимическими методами содержания нейтральных мукополисахаридов (НМПС) по методу А. Шабаша, сиало- (СМ) и сульфомуцинов (СФ) – окраска альциановым синим, соответственно, при Ph 1,0 и 2,5 – по методу S. Spiecer [10].

Другие кусочки сразу же после взятия погружали в жидкий азот. После глубокого замораживания кусочки монтировались на объектодержатели по принципу «контроль-опыт» и помещались в криостат при температуре -15°C . Изготовленные одномоментно из материала контрольных и опытных животных криостатные срезы толщиной 10 мкм монтировались на предметные стекла и обрабатывались гистохимическими методами для выявления сукцинатдегидрогеназы (СДГ) – фермента, связанного с циклом Кребса по методу M. Nachlas et al., лактатдегидрогеназы (ЛДГ) – фермента, связанного с гликолитическим циклом по R. Hess et al., дегидрогеназы восстановленного НАДН (НАДН-ДГ) – фермента, связанного с транспортом электронов по M. Nachlas et al. и кислой фосфатазы (КФ-аза) – маркерного фермента лизосом по Н. Номори. Все гистохимические реакции на ферменты сопровождалась бессубстратными контролями [10].

Количественную оценку содержания мукополисахаридов в слизепroduцирующих экзокриноцитах собственных желез желудка определяли по 4-балльной системе: 1 балл – в виде следов, 2 балла – малое, 3 балла – умеренное и 4 балла – большое содержание изучаемого биополимера. Количественную оценку активности ферментов проводили цитофотометрически в монохроматическом свете при длине волны 570 нм с использованием прибора ЦИМФ-2 производства «ЛМО». Полученный весь цифровой материал подвергался статистической обработке на персональном компьютере с применением программы «Statistica».

Результаты и их обсуждение

Установлено, что опытные самки после создания у них экспериментального холестаза и родившиеся от них крысята, по сравнению с таковыми в контроле, медленнее прибавляли в массу. Однако эти различия в разные исследуемые сроки не достоверны. Помимо этого, родившиеся крысята от опытных самок после рождения существенно отставали в физическом развитии. Тщательным изучением гистологических препаратов донной области желудка с применением метода морфометрии

установлено, что у 15 суточных опытных крысят толщина собственного слоя слизистой оболочки и длина тел собственных желез желудка были статистически достоверно уменьшены. Глубина желудочных ямочек также уменьшена, но недостоверно (рис. 1), и однако плотность их расположения в слизистой желудка, как и плотность собственных желез была сниженной соответственно на 18,7 и 13,3 %. Притом, как установлено морфометрически, желудочные ямочки, как и собственные железы желудка, отличались меньшим количеством образующих их клеток, соответственно, $7,98 \pm 0,19$ и $28,1 \pm 0,27$ при $11,2 \pm 0,25$ и $31,2 \pm 0,29$ клеток в контроле ($p < 0,001$) (рис. 2).



Рис. 1. Показатели слизистой оболочки донной области желудка 15-суточных крысят по данным морфометрии. М±т. Примечание: * - показатели достоверны ($p < 0,001$)

Изменен и качественный состав экзокриноцитов в собственной железе, в первую очередь, за счет уменьшения высококодифференцированных экзокриноцитов – париетальных ($6,71 \pm 0,22$ при $7,77 \pm 0,18$ в контроле, $p < 0,05$) и главных ($11,15 \pm 0,22$ при $13,34 \pm 0,33$ в контроле, $p < 0,001$). Уменьшено количество и мукоцитов в железе ($4,88 \pm 0,10$ при $5,51 \pm 0,11$ в контроле, $p < 0,001$). Количество же шеечных мукоцитов в собственных железах опытных крысят было, наоборот, увеличено ($5,62 \pm 0,12$ при $4,83 \pm 0,11$ в контроле, $p < 0,001$) (рис. 2).

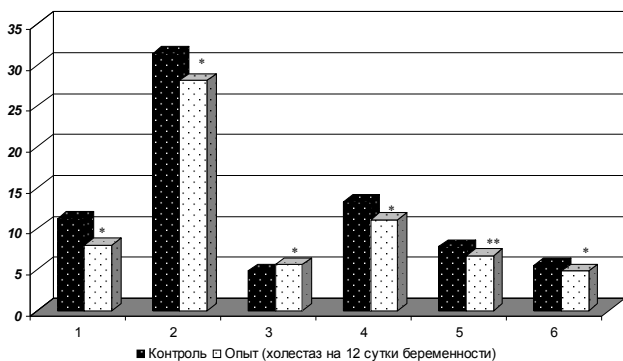


Рис. 2. Количественный и качественный состав желудочных ямок и собственных желез желудка по данным морфометрии. М±т. 1. Количество эпителиоцитов в желудочной ямке. 2. Количество экзокриноцитов в собственной железе. 3. Число шеечных экзокриноцитов. 4. Количество главных экзокриноцитов. 5. Число париетальных клеток. 6. Число мукоцитов в железе. Примечание: * - показатели достоверны ($p < 0,001$), ** - показатели достоверны ($p < 0,05$)

Вышеуказанные экзокриноциты опытных крысят отличались от таковых в контроле структурными и тинкториальными свойствами. Поверхно-

стно-ямочные эпителиоциты желудочных ямочек были меньшей высоты и отличались сниженными оксифильными свойствами их цитоплазмы. Париетальные экзокриноциты у опытных животных отличались выраженным полиморфизмом и зачастую с выраженными явлениями микровакуолизации цитоплазмы, оксифильные свойства которой неоднозначно снижены. Базофильные свойства главных экзокриноцитов у опытных крысят также, как и их размеры, уменьшены, они располагались в железе в виде клеточных конгломератов. В области расположения шеечных клеток, несмотря на увеличение их количества, митотически делящиеся формы встречались реже.

Изменены и цитохимические свойства экзокриноцитов.

Содержание НМПС в поверхностной слизи по данным морфометрической оценки незначительно снижено (рис. 3).

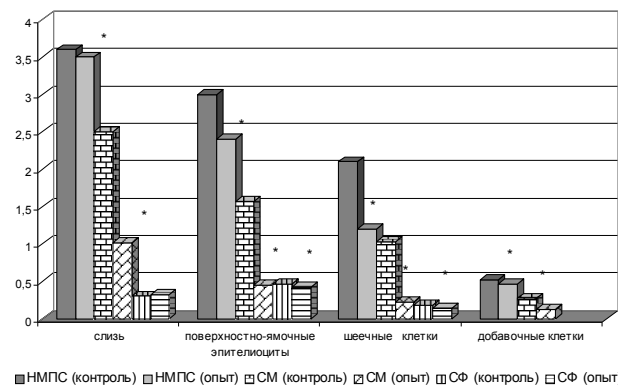


Рис. 3. Количественные показатели изменений нейтральных мукополисахаридов, сиало- и сульфомуцинов в поверхностной слизи; и слизеобразующих экзокриноцитах донного отдела желудка крысят контрольной и опытной (родившихся в условиях холестаза) групп. М±т. Примечание: * - показатели достоверны ($p < 0,001$)

В цитоплазме поверхностно-ямочных эпителиоцитов, шеечных эпителиоцитах и мукоцитах собственных желез содержание НМПС было также сниженным, однако последнее имело очаговый характер. Несмотря на снижение содержания НМПС в апикальных отделах ямочных эпителиоцитах в области расположения комплекса Гольджи, постоянно обнаруживались, но в весьма меньшем количестве, чем в контроле, гранулы вновь синтезированных биополимеров. Последнее свидетельствует о том, что у опытных животных фаза синтеза НМПС угнетена более значительно, нежели фаза экстрезии, что и проводит к уменьшению их содержания в слизеобразующих клетках и поверхностной слизи.

Содержание СМ в поверхностно-ямочных эпителиоцитах, шеечных эпителиоцитах и мукоцитах снижается более резко, нежели НМПС, и последнее носит повсеместный характер. Резкое уменьшение содержания последних, за редким исключением, наблюдается и в поверхностной слизи (рис. 3).

Уменьшение содержания в слизеобразующей

щих клетках сульфомуцинов было незначительным, но имело выраженный очаговый характер. В поверхностной слизи, как показал морфометрический анализ, содержание сульфомуцинов было незначительно увеличенным. Однако последнее статистически недостоверно (рис. 3).

Изменена в изучаемых экзокриноцитах опытных крысят и активность ферментов.

Активность СДГ в экзокриноцитах собственных желез, за исключением шеечных, резко снижена и последнее зависело от типа клетки и места расположения в железе. Так, снижение активности ЛДГ в париетальных экзокриноцитах, расположенных в области доньшек желез, было более значительным, нежели у тех, что располагались в области шеек. Последнее может свидетельствовать о неодинаковой степени развития в этих клетках структурных изменений и, в первую очередь, со стороны митохондриального аппарата, принимающего активную роль в кислотообразовании. Изменялась конфигурация продуктов реакции. Последние, особенно в цитоплазме париетальных и главных экзокриноцитов, приобретали вид более крупной зернистости и зачастую имели неравномерный характер распределения (рис. 4).

Активность ЛДГ, как показало цитофотометрическое исследование, была также сниженной (рис. 4). Притом это снижение также зависело от типа клеток и их расположения в железе.

Весьма значительным во всех изучаемых экзокриноцитах собственных желез крысят, родившихся в условиях холестаза было уменьшение НАДН-ДГ. Исключение составили поверхностно-ямочные эпителиоциты, в которых изменения активности фермента были менее наглядными (рис. 4).

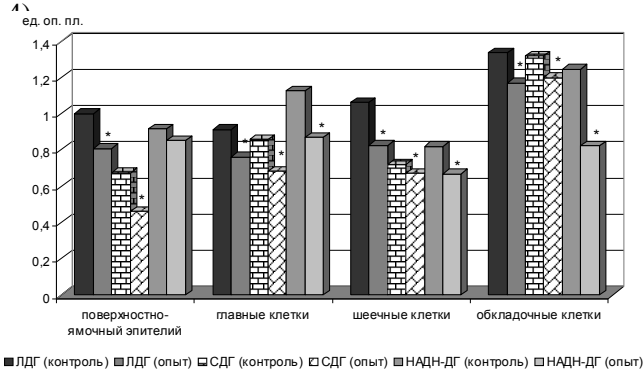


Рис. 4. Количественные показатели изменений активности СДГ, ЛДГ, НАДН-ДГ в экзокриноцитах собственных желез желудка 15-суточных крысят контрольной и опытной групп по данным цитофотометрии (в ед. оп. пл.). М±т. Примечание: * - показатели достоверны ($p < 0,01$)

Активность кислой фосфатазы была, наоборот, увеличенной. Притом, как показали данные цитофотометрических исследований, увеличение было весьма значительным в экзокриноцитах шеек, менее в париетальных, главных и поверхностно-ямочных эпителиоцитах (рис. 5).

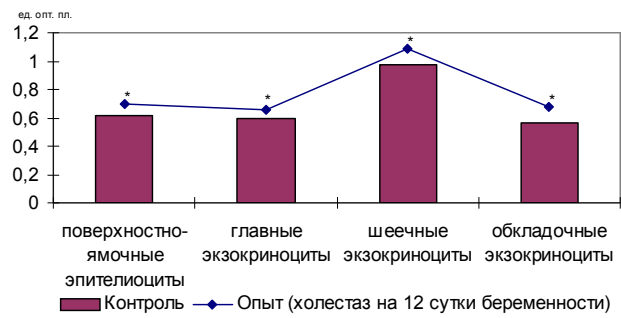


Рис. 5. Активность КФ-азы в экзокриноцитах собственных желез желудка 15-суточных крысят по данным цитофотометрии. М±т. Примечание: * - показатели достоверны ($p < 0,01$).

Таким образом, подытоживая результаты исследований, становится очевидным, что развитие слизистой оболочки донного отдела желудка у крысят, родившихся от самок, которым на 12-е сутки беременности вызывался обтурационный холестаз, задерживается.

Тормозится и процесс развития собственных желез, что выражается не только в уменьшении их длины, но и числа образующих их экзокриноцитов и изменением их качественного состава – количество париетальных, главных экзокриноцитов, мукоцитов уменьшено, а шеечных, наоборот, увеличено. Последнее свидетельствует о том, что холестатическое состояние материнского организма в значительной степени угнетает не столько пролиферацию клеток в железе, сколько процесс их дифференцировки.

Уменьшение в экзокриноцитах активности СДГ, ЛДГ и НАДН-ДГ свидетельствует об изменениях в последних энергетического метаболизма в худшую сторону, не способствующей активации внутриклеточных синтетических процессов, а также процессам дифференцировки. Это способствует, вероятно, и развитию в экзокриноцитах деструктивных процессов (микровакуолизации, изменение тинкториальных свойств). Подтверждением этого является увеличение активности маркерного фермента лизосом – кислой фосфатазы, направленного на утилизацию, возможно, деструктивно измененных клеточных органелл или клеток в целом. Последнее в целом существенно отражается и на функциональных способностях экзокриноцитов. Так, в слизепroduцирующих клетках нарушается секреторный цикл – фаза синтеза тормозится, а фаза экстрезии существенно не меняется, что приводит к уменьшению в цитоплазме слизепroduцирующих клеток этих соединений. Последнее, надо полагать, существенно уменьшит барьерную способность слизистой желудка от воздействия агрессивных факторов желудочного сока.

Литература

- Андрушук А.А., Казмирчук В.Е., Леонтович Н.А., Запорожец О.Ф. Роль антенатальной патологии в становлении иммунитета детей раннего возраста // Актуальная охрана плода и профилактика перинатальной патологии: тез. докл. Киев, 1979. С. 14-15.

- 2 Брюхин Г. В., Михайлова Г. И. Антителообразующая способность клеток селезенки потомства самок крыс с хроническим поражением печени // Физиологический журнал. 1989. Т. 35, №2. С. 97-100.
- 3 Вторушина Е. В. Репродуктивная способность потомства самок крыс с хроническим поражением гепатобилиарной системы // Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Челябинск, 2003. 23 с.
- 4 Ганиткевич Я. В. Роль желчи и желчных кислот в физиологии и анатомии организма // Киев: Наукова думка 1980. 178 с.
- 5 Грющок Р. И. Особенности развития детей при хронических заболеваниях печени у матери // Педиатрия. 1970. С. 59-61.
- 6 Дахно А. Н. Определение функционального состояния желчевыводящей системы у новорожденных детей первых дней жизни // Физиол. и биохимич. аспекты патол. процессов: Сб. науч. тр. Витеб. мед.ун-т. Смоленск, 1990. С. 44-46.
- 7 Закревский А. А. Беременность и роды при хронических заболеваниях печени и желчных путей // Антенатальная охрана плода и профилактика перинатальной патологии: тез. докл. Киев, 1979. С. 98-99.
- 8 Кизюкевич Л. С., Туревский А. А., Шелестная Е. А. Показатели метаболизма почек при экспериментальном холестазе и последующей хирургической декомпрессии желчных путей // Морфология. 2000. Т. 117, №3. С. 56-57.
- 9 Мацюк Я. Р., Туревский А. А., Кизюкевич Л. С., Марголь С. К. Морфологические изменения фолликулов щитовидной железы в ранние сроки холестаза // Весці АН Беларусі. 1995. №2. С. 96-100.
- 10 Пирс А. Г. Гистохимия теоретическая и прикладная // М.: Иностранная литература. 1962.
- 11 Приображенский В. Н., Василенко В. В., Таяновский В. Ю. Новые подходы к диагностике и лечению холелитиаза в профессиональных группах молодого возраста // Клиническая медицина. 1987. Т. 75. № 4. С. 22-23.
- 12 Петухов В. А., Кузнецов М. Р., Лисин С. В., Кантемирова З. Р. Желчекаменная болезнь и беременность: причинно-следственные взаимосвязи // Анналы хирургии. 1998. №2. С. 14-20.
- 13 Туревский А. А., Можейко Л. А., Кизюкевич Л. С., Емельянчик С. В. с соавт. Структурно-функциональные сдвиги при экспериментальной ахолии // Актуал. вопросы морфологии: тез. докл. III съезда анат., гистол., эмбр. и топографоанатомов. УССР, Черновцы. 1990. С. 321.
- 14 Шехтман М. М. Экстрагенитальная патология и беременность // Л.: Медицина. 1987. 296 с.
- 15 Шехтман М. М., Коротько Г. Ф., Бурков С. Г. Физиология и патология органов пищеварения у беременных // Ташкент: Медицина. 1989. 160 с.
- 16 Britton J. P., Britton H. L. Cholestasis of pregnancy and intrauterine intestinal obstruction // J. Maternal. Fetal Med. 1992. V. 1. N 6. P. 286-288.
- 17 Fuzi D., Corsello F. P., Piacentino R., Marchino J. L. // Minerva ginecol. 1993. V. 45. N. 6. P. 307-314.
- 18 Kountoura S., Schener P., Billing B. Effect of prolonged bile duct obstruction in the rat on hepatic transport of bilirubin // Clin. Sci. 1985. V. 68. N. 3. P. 341-347.
- 19 Nokila K., Riikonen S., Lindfors M., Miettinen T. Serum squalene and noncholesterol sterols before and after delivery in normal and cholestatic pregnancy // J. Lipid Res. 1996. V 37. N. 12. P. 2687-2695.
- 20 Plaza F. J., Diaz R. J., Pardo O., Perez C. Colestasis intrahepatica del embarazo. Una enfermedad benigna // Rev. Esp. Enferm. Digest. 1996. V. 88. N. 11. P. 809-811.
- 21 Serano M. A., Brites D., Monte M. J., Bravo P. Cholestasis of the pregnancy affects the kinetics of bile acid transport across the human placenta: [Pap] // Sci. Meet. Physiol. Soc., Salamanca, 2-5 Oct., 1995 / J. Physiol. Proc. 1996. N. 493. P. 101.
- 22 Sing Li, Yanbang Chi, Xuesun F. Zhongguo puwai sicu yu linchuang zazhi // Clun. S. Bases and Clin. Seery. 1998. V. 5. N. 3. P. 148-149.
- 23 Shgizo Tau, Weiyue Z., Su X., Guargian L. Huaki Vike duxue xue bao // S. West. China Univ. Med. Sci. 1999. V. 30. N. 2. P. 210-213.

Summary

STRUCTURAL AND CYTOCHEMICAL PROPERTIES OF EXOCRINOCYTES TAKEN FROM THE INTRINSIC GLAND OF 15-DAY-OLD RATS BORN AFTER THE MATERNAL CHOLESTASIS EXPERIMENTALLY INDUCED DURING EMBRYOGENESIS Y.R. Matsiuk, A.A. Karchevsky Grodno State Medical University

In the experiments with 15-day-old pups (n=15) the complex of histological and cytochemical methods and the following morphometric, cytophotometric and statistical analysis revealed that the subhepatic obturational cholestasis induced in pregnant rats during the individualization of organ precursors in their embryos largely retarded the development of gastric mucosa and intrinsic gastric glands. In the intrinsic gastric glands the total exocrinocyte amount was low, and their distribution changed (smaller fractions of main, parietal and mucoid cells, and larger neck-form cell fraction). The activity of succinate dehydrogenase, lactic dehydrogenase and NADH dehydrogenase was decreased, thereby inhibiting the synthesis of glycoprotein, sialo- and sulfomicins in the mucus-producing cells and then considerably decreasing the levels of these molecules in the surface mucus. Inversely, acid phosphate activity was high, indicating the development of destructive process in the exocrinocytes. The tinctorial properties of exocrinocytes were inhibited too.

Поступила 04.06.07