

УДК - 616.348:[616.36-008.811.6:618.3-06]-092.9

## МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ОБОДОЧНОЙ КИШКИ 15-ДНЕВНЫХ КРЫСЯТ, РАЗВИВАЮЩИХСЯ В УСЛОВИЯХ ХОЛЕСТАЗА МАТЕРИ

Я.Р. Мацюк, Е.Ч. Михальчук, Е.А. Шелесная

УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

*В эксперименте на 16 самках и взятых от них 19 крысятах с применением гистологических и цитохимических методов с последующим морфо-цитометрическим и статистическим анализом установлено, что экспериментально моделируемый на 17 сутки беременности подпеченочный обтурационный холестаз вызывает у 15-дневного потомства задержку развития оболочек стенки ободочной кишки, формирования складок и крипт. Снижение активности СДГ, НАДН-ДГ и увеличение ЛДГ в поверхностных эпителиоцитах толстой кишки свидетельствует о нарушении энергетического метаболизма, что приводит к угнетению дифференцировки клеток и торможению в них синтетических процессов. Последнее подтверждается уменьшением в эпителиоцитах содержания гликопротеинов и сиаломуцинов.*

**Ключевые слова:** беременность, холестаз, потомство, ободочная кишка.

### Введение

При холестазе, развивающемся в кишечнике как следствие различных заболеваний печени и желчевыводящих путей, или моделируемом в эксперименте, имеет место наиболее выраженное из всех компонентов желчи увеличение в крови содержания желчных кислот [2, 10]. Последние, как единственный специфический компонент желчи, составляют около 60% ее органического состава и являются постоянной составляющей внутренней среды организма [1]. Благодаря высокой способности встраиваться в липидный комплекс мембран, желчные кислоты могут изменять их структуру, активировать в них процессы ПОЛ и нарушать функции клеток и органов в целом [10, 11].

Установлено, что холестаз беременных оказывает неблагоприятное воздействие на потомство - задерживает его физическое развитие, снижает резистентность, тормозит становление у него структурных и цитохимических свойств желудка, кишечника, почек [5-9]. Какое воздействие оказывает холестаз матери на толстый кишечник у развивающегося потомства, изучено недостаточно. Последнее и послужило мотивацией для проведения исследования по изучению особенностей структурных и цитохимических свойств ободочной кишки у 15-суточных крысят, развивающихся в условиях эндогенной интоксикации при холестазе беременных.

### Материал и методы

Исследования выполнены в соответствии с Хельсинской декларацией о гуманном обращении с животными. Эксперимент проведен на 19 крысятах 15-суточного возраста, полученных от 16 самок изначальной массой 180-210 г. 10 крысят, взятые от 9 самок, которым на 17 день беременности экспериментально моделировали подпеченочный обтурационный холестаз по Кизюкевичу Л.С. [3], составили опытную группу. Остальные 9 крысят, родившиеся от 7 самок, которым в тот же срок беременности производилась лишь лапаротомия, служили контролем. Опытные и контрольные животные находились в одинаковых условиях вивария. На 15 сутки после рождения крысят контрольной и опытной групп взвешивали и умерщвляли парами эфира. Из одних и тех же участков ободочной кишки сразу забирали материал.

Одни кусочки после фиксации в жидкости Карнуа заключали в парафин. Изготовленные парафиновые срезы толщиной 5 мкм после окрашивания гематоксилином и эозином использовали для гистологических и морфометрических исследований. Последние проводили с по-

мощью системы компьютерного анализа изображений «Bioscan NT 9.0» при увеличении микроскопа Care Zeiss (Германия) в 40 раз и цифровой видеокамеры (Panasonic Color CCTV Camera WV-CP40/G, Япония) в 7 раз.

Срезы толщиной 10 мкм использовали для определения в поверхностных эпителиоцитах и бокаловидных клетках гликопротеинов по А.Шабадашу, гликозаминогликанов (сиало- и сульфомуцинов) по S.Spicer и рибонуклеопротеинов по Э.Эйнарсону [7].

Другие кусочки сразу после взятия подвергались глубокому замораживанию в жидком азоте с последующим монтированием их по принципу «контроль-опыт» на объектодержатели криостата фирмы «Leica CM-1850» при минус 15°C. Изготовленные одновременно из материала контрольных и опытных животных криостатные срезы толщиной 10 мкм использовали для определения в эпителии слизистой оболочки ободочной кишки активности дегидрогеназы сукцината (СДГ) по N. Nachlas et al. (1957), лактата (ЛДГ) по R. Hess et al. (1958), восстановленного НАД (НАДН-ДГ) по M. Nachlas et al. и кислой фосфатазы (КФ) по G. Gomori (1950). Все исследования сопровождалось бессубстратными контролями [7]. Количественную оценку активности ферментов проводили с использованием той же аппаратуры, что и при морфометрии, и выражали в единицах оптической площади (ед. опт. пл.).

Иллюстрированный материал получали с помощью микроскопа Axioscop 2 plus (Zeiss, Германия) со встроенной видеокамерой Axio Cam MK с 5 (Zeiss, Германия) и программы Axio Vision AC 4,1 (Zeiss Vision Gmb H, Германия) при разных увеличениях объектива.

Полученный цифровой материал обрабатывали методом параметрической статистики на персональном компьютере с применением пакета программ «Statistica 6.0» для Windows.

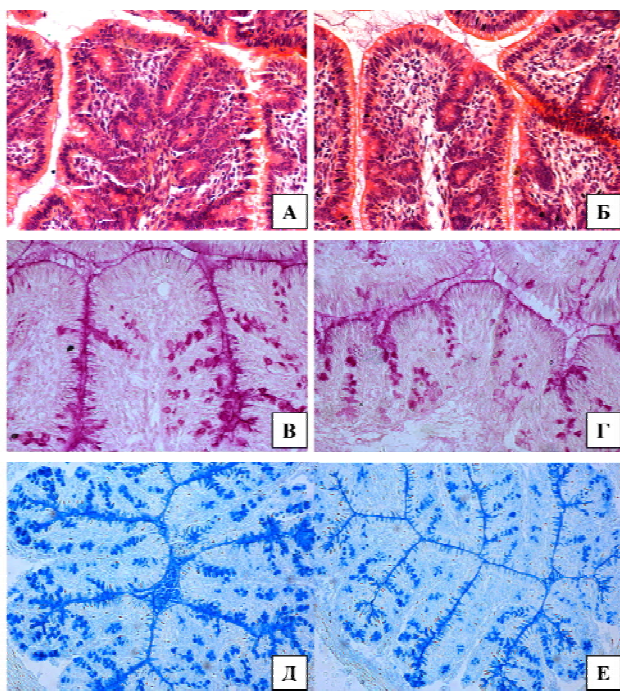
### Результаты исследования и обсуждение

Проведенные исследования показали, что у 15-суточных крысят контрольной группы стенка ободочной кишки довольно тонкая, как и входящие в ее состав оболочки, особенно слизистая (таблица 1). Несмотря на это все ее структуры сформированы. Складки слизистой небольшие, призматической и конической формы, расположены близко одна от другой. Впячиваясь в полость кишки, они заполняют ее просвет, в котором находится секрет слизистого характера, богатый гликопротеинами и сиаломуцинами (рисунок 1 В, Д). Складки выстланы однослойным призматическим эпителием. Последний, впя-

чиваясь в собственную пластинку слизистой оболочки, образует крипты, имеющие в большинстве форму трубочек. Крипты в основном располагаются упорядоченно. Среднее число эпителиоцитов в них составляет  $22,1 \pm 0,5$  клетки. Почти половина из них представлена бокаловидными клетками ( $9,1 \pm 0,3$ ) (таблица 1). Многие из них в гистологических препаратах выявляются с трудом, вероятно, из-за низкой степени дифференцировки. Несмотря на это, в бокаловидных клетках уже идет синтез секреторных гранул, дающий положительную реакцию на гликопротеины и сиаломуцины, что облегчает подсчет клеток (рисунок 1 В, Д).

Эти биополимеры также выявляются в комплексе Гольджи апикального отдела эпителиоцитов и в тонкой пленке слизи, находящейся на поверхности эпителиоцитов. Наличие в комплексе Гольджи эпителиоцитов небольших гранул мукополисахаридов свидетельствует об их синтезе (рисунок 1 В, Д).

Активность ферментов в поверхностных эпителиоцитах и бокаловидных клетках не высокая. По возрастанию цитохимической активности их можно расположить в следующем порядке: СДГ, ЛДГ и НАДН·ДГ (таблица 2).



**Рисунок 1 - Структурно-цитохимические показатели ободочной кишки 15-суточных крысят опытной и контрольной групп**

А - общий вид складок крипт слизистой оболочки крысенка контрольной группы; Б - опытной. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 200; В - гликопротеины в поверхностных эпителиоцитах и бокаловидных клетках ободочной кишки крысенка контрольной группы; Г - опытной. Окраска по Шабдашу. Ув. 200; Д - сиаломуцины в бокаловидных клетках и эпителиоцитах слизистой оболочки ободочной кишки крысенка контрольной группы; Е - сиаломуцины в бокаловидных клетках и эпителиоцитах слизистой оболочки ободочной кишки крысенка опытной группы. Окраска альциановым синим при рН 2,5 по Spicer. Ув. 200

**Таблица 1 - Морфометрические показатели ободочной кишки 15-суточных крысят, развивающихся в условиях холестаза матери**

| Группы    | Толщина стенки, мкм  | Толщина слизистой, мкм | Плотность крипт (10x40) | Глубина крипт, мкм | Количество      |                            |                              | Толщина мышечной оболочки в крипте, мкм |
|-----------|----------------------|------------------------|-------------------------|--------------------|-----------------|----------------------------|------------------------------|---|
|           |                      |                        |                         |                    | клеток в крипте | из них бокаловидных клеток | митотически делящихся клеток |   |
| кон-троль | $376,6 \pm 14,4$     | $142,9 \pm 2,8$        | $7,6 \pm 0,2$           | $87,5 \pm 2,0$     | $22,1 \pm 0,5$  | $9,1 \pm 0,3$              | $1,3 \pm 0,2$                | $54,9 \pm 2,3$                          |
| опыт      | $304,8 \pm 5,9^{**}$ | $120,0 \pm 2,6^{***}$  | $7,1 \pm 0,2$           | $83,3 \pm 2,3$     | $20,5 \pm 0,8$  | $8,0 \pm 0,2$              | $0,97 \pm 0,2$               | $51,4 \pm 2,1$                          |

Примечание: \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Показатели достоверности даны в сравнении с контролем

**Таблица 2 - Показатели активности ферментов и содержание РНП в поверхностных эпителиоцитах и бокаловидных клетках ободочной кишки 15-суточного потомства развивающегося в условиях холестаза матери (ед. опт. пл.)**

| Ферменты | Группы   | Поверхностный эпителий | Бокаловидные клетки |
|----------|----------|------------------------|---------------------|
| СДГ      | контроль | $0,337 \pm 0,032$      | $0,310 \pm 0,025$   |
|          | опыт     | $0,199 \pm 0,021^*$    | $0,188 \pm 0,012^*$ |
| ЛДГ      | контроль | $0,386 \pm 0,036$      | $0,188 \pm 0,02$    |
|          | опыт     | $0,440 \pm 0,033$      | $0,282 \pm 0,021^*$ |
| НАДН·ДГ  | контроль | $0,418 \pm 0,04$       | $0,347 \pm 0,024^*$ |
|          | опыт     | $0,387 \pm 0,02$       | $0,254 \pm 0,014^*$ |
| РНК      | контроль | $0,373 \pm 0,029$      | $0,340 \pm 0,020$   |
|          | опыт     | $0,375 \pm 0,021$      | $0,330 \pm 0,025$   |

Примечание: \* -  $p = 0,0001$ . Показатели даны в сравнении с контролем

При определении активности СДГ обнаруживаемые гранулы формазана в виде мелкой зернистости располагаются в базальном отделе цитоплазмы эпителиоцитов и бокаловидных клетках, а также в виде тонкого ободка вокруг ядра. При определении активности ЛДГ продукты реакции располагаются преимущественно около ядерной области эпителиоцитов и апикальном отделе. В бокаловидных клетках они видны преимущественно в виде узкого ободка вокруг ядра. При определении активности НАДН·ДГ гранулы формазана наблюдаются преимущественно в апикальном отделе эпителиоцитов и в очень малом количестве вокруг ядра. В бокаловидных клетках они определяются также вокруг ядра и очень мало вокруг секреторных гранул.

Продукты реакции при окрашивании РНК галлоцианином-хромовыми квасцами по Эйнарсону преимущественно располагаются в цитоплазме эпителиоцитов в базальном отделе и в меньшей мере в апикальном, а в бокаловидных клетках - вокруг секреторных гранул.

В окружающей крипты рыхлой соединительной ткани наблюдается обилие кровеносных капилляров и клеточных элементов, среди которых определяются клетки фибропластического ряда, тканевые базофилы и немногочисленные лимфоциты. Среди эпителиоцитов крипт и поверхностного эпителия часто встречаются митотически делящиеся формы. Мышечная оболочка довольно тонкая, особенно её наружный мышечный слой. Толщина внутреннего слоя составляет  $44,4 \pm 2,7$  мкм при  $54,9 \pm 2,3$  мкм ширины всей мышечной оболочки (таблица 1).

Между мышечными слоями рыхлой соединительной ткани часто обнаруживаются ганглии межмышечного нервного сплетения.

У 15-дневных крысят, развивавшихся в условиях холестаза матери (опыт), толщина стенки ободочной кишки тоньше ( $304,8 \pm 5,9$  мкм при  $376,6 \pm 14,4$  мкм в контроле,  $p < 0,01$ ) преимущественно за счет слизистой оболочки. Изменение в толщине мышечной оболочки было незначительным (таблица 1). Складки слизистой оболочки от-

личались полиморфизмом, преимущественно сглажены, уплощены. Высота выстилающих их эпителиоцитов не претерпевала значительных изменений ( $21,0 \pm 0,6$  мкм при  $21,8 \pm 0,4$  мкм в контроле). Существенно не менялись и тинкториальные свойства эпителиоцитов. Однако довольно часто их апикальные отделы подвергались микровакуолизации (рис. 1 Б). Нередко между эпителиоцитами наблюдались расширения межклеточных пространств. Ядра эпителиоцитов приобретали овальную или удлиненную форму. Хроматин в них становился крупноглыбчатым и, как правило, с периферической локализацией. Ядрышки компакты, без отчетливых различий в структуре, однако их локализация в ядре не постоянна - в одних ядрах они находятся в центре, в других - вблизи внутренней ядерной мембраны.

Замедлены темпы образования крипт. Плотность их расположения уменьшена, длина крипт укорочена, проявлялась тенденция к уменьшению размеров входящих в их состав эпителиоцитов и бокаловидных клеток. Притом отдифференцировать последние становилось еще труднее, чем в контроле. В них менее отчетливо выделялись апикальные отделы. Более четко эти клетки определялись в препаратах, окрашенных на мукополисахариды. Содержание в них гликопротеинов и сиаломуцинов уменьшалось. Реже и в меньшем количестве они встречались в области комплекса Гольджи эпителиоцитов, что свидетельствует об угнетении их синтеза. Гораздо реже мукополисахариды обнаруживались как в поверхностной слизи, так и в слизи просвета кишки (рисунок 1 Г, Е). Все это свидетельствует о нарушении фаз секреторного процесса, притом более отчетливо фазы синтеза, нежели экстрюзии. Этому способствовали изменения активности ферментов энергетического метаболизма: активность фермента цикла Кребса - СДГ и НАДН·ДГ уменьшалась, а фермента гликолиза ЛДГ, наоборот, возрастала. Выявленные изменения способствовали не только угнетению процессов пролиферации эпителиоцитов, что подтверждалось уменьшением в крипте митотически делящихся форм (таблица 1), но и процессов их дифференцировки.

Межкриптные прослойки собственной пластинки слизистой оболочки увеличены, кровеносные капилляры в ней часто расширены. Клеточный состав их напоминал таковой в контроле, однако в нем чаще появлялись лимфоциты. Последние встречались и в расширенных межэпителиальных пространствах слизистой оболочки.

Таким образом, установлено, что у 15-дневных крысят, развивающихся в условиях экспериментально вызванного на 17 сутки беременности крыс подпеченочно-обтурационного холестаза, задерживается развитие

слизистой и мышечной оболочек стенки ободочной кишки, и особенно слизистой. В последней уменьшена складчатость рельефа, задерживается процесс формирования крипт. В эпителиоцитах и бокаловидных клетках значительное снижение активности ферментов цикла Кребса и увеличение активности фермента гликолиза, свидетельствующих о нарушении энергетического метаболизма, вызывает не только замедление процессов пролиферации и дифференцировки эпителиоцитов, но и синтетических процессов, что подтверждается уменьшением в них содержания гликопротеинов и сиаломуцинов.

#### Литература

1. Ганиткевич, Я.В. Роль желчи и желчных кислот в физиологии и патологии организма [Текст]: монография. - Киев: Наукова думка. 1980. - 178с.
2. Кизюкевич, Л.С. Состояние тканевого гомеостаза почечной паренхимы через 24 часа от начала моделирования внепеченочного обтурационного холестаза [Текст] / Л.С. Кизюкевич, О.Е. Кузнецов, И.Э. Гуляй // Журнал ГрГМУ. - 2011. - №4 - С.94-97.
3. Кизюкевич, Л.С. Реактивные изменения в почках при экспериментальном холестазах [Текст]: монография. - Гродно. 2005. - 219с.
4. Мацюк, Я.Р. Структурные особенности собственных желез желудка крысят, родившихся от матерей с экспериментальным холестазом, вызванным в период фетогенеза [Текст] / Я.Р. Мацюк, Е.Ч. Михальчук // Журнал Морфология - 2007. - №3 - С. 80-81.
5. Михальчук, Е.Ч. Влияние обтурационного холестаза матери, вызванного в период фетогенеза, на течение беременности, плодовитость, физическое развитие потомства и его жизнеспособность [Текст] / Е.Ч. Михальчук, Я.Р. Мацюк // Журнал ГрГМУ - 2007. - №2. - С.43-45
6. Михальчук, Е.Ч. Структурные особенности почек потомства белых крыс при воздействии обтурационного холестаза во время беременности [Текст] / Е.Ч. Михальчук, Я.Р. Мацюк // Журнал Морфология - 2007. - №3 - С. 82-83.
7. Пирс, Э. Гистохимия теоретическая и прикладная [Текст]: монография. - М.: Ин. лит.- 1962. - 962с.
8. Показатели неспецифической клеточной и гуморальной резистентности, компонентов прооксидантно-антиоксидантного равновесия у потомства крыс, родившегося в условиях холестаза, экспериментального вызванного в период фетогенеза [Текст] / Я.Р. Мацюк и [др.] // Журнал ГрГМУ. - 2007. - №2 - С.29-31
9. Чернышев, Ю.Н. Морфологические и цитохимические особенности двенадцатиперстной кишки 15-суточных крысят, родившихся в условиях холестаза [Текст] / Ю.Н. Чернышев, Я.Р. Мацюк // Журнал ГрГМУ. - 2011. - №2. - С. 19-22.
10. Шерлок, Ш. Заболевания печени и желчных путей [Текст]: монография / Ш. Шерлок, Дж. Дули. - М.: ГЭОТАР. Медицина, 1999. - 858 с.
11. Шехтман, М.М. Экстрагенитальная патология и беременность / М.М. Шехтман - Л.: Медицина, 1987. - 296 с.

## MORPHOFUNCTIONAL PROPERTIES OF THE COLON IN THE 15-DAY INFANT RATS DEVELOPING IN CHOLESTASIS OF MOTHER

Ya.R. Matsyuk, E.Ch. Mikhalchuk, E.A. Shelesnaya

Educational Establishment «Grodno State Medical University», Grodno, Belarus

*The experimental study of 16 female rats and their 19 infants by histological, cytochemical methods with the subsequent morphometric, cytophotometric and statistical analysis showed that subhepatic obstructive cholestasis simulated on the 17<sup>th</sup> day of pregnancy caused delayed development of colonic wall membranes and the formation of folds and crypts in the 15-day offspring. Decrease in the activity of succinate dehydrogenase, NADH dehydrogenase and elevation of lactic dehydrogenase in the superficial epithelial cells indicates the disturbed energy metabolism that leads to the inhibition of cell differentiation and synthetic processes in the cells. The latter is confirmed by the decrease in glycoproteins and sialomusines in the epithelial cells.*

**Key words:** pregnancy, cholestasis, offspring, colon.