

УДК 591.433:[615.277.3+615.3

© Федченко С.Н., Галузіна Л.О., 2011

УЛЬТРАСТРУКТУРНИЙ АНАЛІЗ ЕНДОКРИНОЦИТІВ ЖЕЛУДКА КРИС ПОСЛЕ ИНГАЛЯЦИОННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ПАРАМИ ТОЛУОЛА

Федченко С.Н., Галузіна Л.О.

ДЗ Луганский государственный медицинский университет

Федченко С.Н., Галузіна Л.О. Ультроструктурний аналіз ендокриноцитів желудка крыс после ингаляционного воздействия парами толуола // Український морфологічний альманах. – 2011. – Т. 9, № 1. – С. 135-138.

Ультроструктурний аналіз дозволив підтвердити неоднакову реакцію ендокриноцитів різного типу на токсичне вплив парів толуола, що, ймовірно, може відображати й різний ступінь їх участі в реалізації ефектів ксенобіотика на шлунок. Встановлено, що ендокринні клітини реагують на інтоксикацію толуолом неспецифічними змінами органел загального призначення. При цьому, наряду з обычними формами секреції – молекулярною екструзією та екзоцитозом, - в апудоцитах відбувається викидання секреторних гранул шляхом лізису останнього в численних вакуолях (дегрануляція)

Ключевые слова: ультроструктура, ендокриноцити, стереологічний аналіз

Федченко С.М., Галузіна Л.О. Ультроструктурний аналіз ендокриноцитів шлунка щурів після інгаляційного впливу парами толуола // Український морфологічний альманах. – 2011. – Т. 9, № 1. – С. 135-138.

Ультроструктурний аналіз дозволив підтвердити неоднакову реакцію ендокриноцитів різного типу на токсичний вплив парів толуола, що, ймовірно, може відображати й різний ступінь їх участі в реалізації ефектів ксенобіотика на шлунок. Встановлено, що ендокринні клітини реагують на інтоксикацію толуолом неспецифічними змінами органел спеціального призначення. При цьому, наряду з однаковими формами секреції – молекулярною екструзією та екзоцитозом, - в апудоцитах відбувається вивільнення секреторних гранул шляхом лізису останнього в численних вакуолях (дегрануляція)

Ключові слова: ультроструктура, ендокриноцити, стереологічний аналіз

Fedchenko S.N., Galuzina L.O. Ultrastructural Analysis of Endocrinocytes of the Stomach in Rats after Inhalation Effect of Toluene vapour // Український морфологічний альманах. – 2011. – Т. 9, № 1. – С. 135-138.

Ultrastructural analysis made in the result of the studies allowed to confirm unequal reaction of endocrinocytes of various types to toxic action of toluene vapour that, probably, may also testify to different degree of their participation in realization of xenobiotic effect on the stomach. It was determined that endocrine cells react to toluene intoxication by non-specific changes in organelles of general purpose. During this process, along with usual forms of secretion – molecular extrusion and exocytosis – ejection of secretory granules in apudocytes occurs by the way of lysis of the latter in numerous vacuoles (degranulation)

Key words: ultrastructure, epithelial cells, stereological analysis

В настоящее время полагают, что желудок является важным эндокринным органом, представленным клетками APUD- системы - апудоцитами. Наиболее крупным звеном APUD- системы является эндокринный аппарат желудка. В связи с этим заслуживают внимание данные ряда авторов о том, что клетки диффузной эндокринной системы (ДЭС) регулируют процессы пищеварения, всасывания, регенерации [1, 2, 3, 4]. Однако роль этих компонентов ДЭС в развитии и прогрессировании морфо-функциональных сдвигов в слизистой оболочке желудка (СОЖ) крыс после хронической интоксикации толуолом не изучена. Отсутствуют данные о связи морфометрических показателей ДЭС и степени деструктивных изменений СОЖ. В связи с вышесказанным изучение данной проблемы представляется актуальным. Задача настоящей работы заключалась в изучении ультроструктурной организации эндокринных клеток СОЖ крыс в различные сроки после ингаляционного воздействия толуолом. Связь с научной темой: "Структурный гомеостаз тканей травного тракту, видальной системы та інтегруючих систем організму (ендокринної, нервової та імунної), його регуляція та корекція змін, що виникають, в умовах дії екологічно небезпечних чинників Держ. Рег.0109U004543.

Материал и методы. Исследование проведе-

но на 48 крысах линии Вистар с исходной массой 150-180г. Животные содержались в индивидуальных клетках в условиях 14 - часового светового цикла при температуре 20-22°C на стандартном рационе вивария. Животные в специальных затравочных камерах подвергались воздействию паров толуола (одного из компонентов эпокси-дных смол) на заданном уровне в течение 4 ч в день по 5 дней в неделю на протяжении 60 дней, в концентрации 10 ПДК. Все животные были разделены на 4 группы (по 6 в каждой). Исследуемые группы распределялись в зависимости от сроков наблюдения после завершения воздействия парами толуола и контроля эксперимента. Животных умерщвляли эфирным наркозом на 1-е (1 серия), 7-е сутки (2 серия); на 30-е (3 серия) и 60-е сутки (4 серия) после 60 дневной затравки толуолом. К каждой из опытных групп было взято по 6 контрольных животных, содержавшихся в аналогичных условиях вивария. Для электронно-микроскопического исследования кусочки фундального и пилорического отделов (СОЖ) размером 1мм³ погружали вначале в глутаральдегидный фиксатор по-Тарановскому на 24 часа. Потом – в 1%-ный тетраоксид осмия по - Паладе на 1 час. После дегидратации в этаноле возрастающей концентрации и абсолютном апетоне, материал заливали смесью эпокси-дных смол (эпон-аралдит). Поли-

меризацию проводили в течение 36 часов при 60°C. Ультратонкие срезы изготавливали на ультрамикротоме УМП-4 Сумского производственного объединения «Электрон» (Украина), контрастировали в растворе уранилацетата и цитрате свинца по Рейнольдсу и просматривали в электронном микроскопе ЭМ-125 того же объединения при ускоряющем напряжении 75кВ. Изучаемый материал документировали в виде негативных и позитивных фотоотпечатков.

Количественный морфометрический анализ каждого гистологического препарата проводился по 6 полям зрения стандартной площади на аппаратно-программном комплексе. Для морфологических исследований было выбрано увеличение 16 000, позволяющее охватить наибольшую площадь исследуемой клетки и, в то же время, отчетливо идентифицировать форму и размеры ее секреторных гранул. На электронных микрофотографиях измеряли диаметр секреторных гранул в 10-15 эндокриноцитах каждого типа и с учетом увеличения микроскопа рассчитывали истинный диаметр гранул.

Аппаратно-программный комплекс состоял из микроскопа Olympus BX-41, адаптеров OLYMPUS C 3040-ADV и USMAD-3, цифрового фотоаппарата OLYMPUS C-5050 (Япония) и компьютера ATHLON 2,2 ГГц. Цифровые изображения слизистой оболочки желудка с разрешением 5 млн пикселей и глубиной цвета 24 бит записывались на CD-диски, далее обрабатывались с помощью специализированного лицензионного пакета прикладных программ «MORPHOLOG», разработанного на кафедре нормальной анатомии ЛуГМУ.

Для эндокринных клеток (G-, ECL-, EC-клетки) определяли: площадь ядра (Sя), площади гетерохроматина (S_{гх}) и эухроматина (S_{эх}), соотношение этих площадей (S_{гх}/S_{эх}), толщину гетерохроматина (L_{гх}); общую площадь секреторных гранул в цитоплазме (S_{сг}), площадь комплекса Гольджи (S_г), общую площадь митохондрий (S_м) в цитоплазме данных клеток.

Морфометрические данные экспортировались в программу Excel для дальнейшей статистической обработки и сохранения, достоверной считалась вероятная погрешность менее 5% (p<0,05).

Результаты исследования и их обсуждение. Проведенные электронно-микроскопические исследования выявили многочисленность общей популяции апудоцитов, чаще всего встречаются EC- и ECL- в фундальном отделе а G- клетки в пилорическом отделе СОЖ. Нейроэндокринный профиль классифицировали по ультраструктурным признакам секреторных гранул (СГ). Основной отличительной чертой EC-клеток является полиморфизм формы зрелых (СГ), содержимое которых, имеет высокую электронную плотность и окружено гладкой непрерывной мембраной. При исследовании на 1 и 7 сутки установлено, что в EC-клетках, продуцирующих серотонин и мелатонин, наблюдалась разная степень выраженности ультраструктурной дезорганизации. В клетках с выраженными повреждениями обращали на себя

внимание значительные расширение цистерн гранулярной цитоплазматической сети и КГ, появление просветленных и увеличенных в размерах митохондрий с частично поврежденными кристами. Начиная с 1 суток в ядрах отдельных EC-клеток увеличивается площадь, занимаемая ГХ на 32% (p<0,05), изменяются соотношения между эу- и гетерохроматином, отмечается его компактизация. К самым ранним ультраструктурным изменениям относится реорганизация ядерного аппарата и особенно ядрышек. Изменяется структура ядрышек (нарушается петлистость нуклеолонемы, происходит сегрегация гранулярного и фибриллярного компонентов). Как результат интоксикации парами толуола в большом числе EC- и ECL-клеток наблюдаются деформация ядер (усиление извилистости ядерной оболочки, появление лопастных форм ядер) и смещение их к плазмалемме (рис. 1б). Сегрегация гранулярного и фибриллярного компонентов ядрышек относится к наиболее ранним этапам их изменений, фрагментация и кольцевидность представляют собой ультраструктурные проявления более выраженных нарушений процессов транскрипции и процессинга рРНК.

Наиболее ярко это проявляется в деструкции как энергопродуцирующих так и биосинтетических аппаратов: о чем свидетельствуют снижение площади митохондрий в EC-клетках на 33% и 36% в 1-й и 2-й сериях соответственно. Площадь, занимаемая КГ снижена в 1,8 раза на 1-е сутки и в 1,43 раза на 7-е сутки. В результате целостность мембран отдельных гранул нарушалась и возникала возможность выхода секрета в цитоплазму, наблюдались эндокриноциты с небольшим количеством СГ и просветленной цитоплазмой (рис. 1б), что свидетельствует о почти полном выведении секрета из клеток. Наряду с этим, появляется большое количество "агранулярных" и малодифференцированных эндокриноцитов. Отдельные серотонинпродуцирующие эндокриноциты находились в состоянии функциональной истощенности, они были дегранулированы и содержали значительно уменьшенное число клеточных оргanelл.

В значительной части клеток КГ с признаками деструкции, его общая площадь в цитоплазме уменьшалась почти в 2 раза, до $8,87 \pm 1,83$ мкм² (p<0,05) и $10,75 \pm 2,47$ (p<0,05) на 1-е и 7-е сутки соответственно. рис. Митохондрии немногочисленны, с нарушением структуры крист. Общая площадь митохондрий у крыс 3-й и 4-й опытной группы достоверно не отличалась от значений контрольной группы.

Следует отметить, что в EC-клетках, наряду с деструктивными процессами, активизируются компенсаторно-приспособительные механизмы, направленные на сохранение клеточного гомеостаза. Поэтому часть наблюдаемых изменений в ультраструктуре EC- и ECL-клеток может рассматриваться не только как начало деструктивных процессов в клетке, но и как адаптивная реакция биологической системы к меняющимся условиям внешней среды. Особенно это выражено на позд-

них сроках экспериментального исследования. Структурные изменения в эпителиоцитах СОЖ после экспериментальной интоксикации толуолом свидетельствует о том, что дегрануляция ЕС-клеток сопряжена с резким выбросом серотонина и мелатонина, которые ингибируя пролиферацию и, по данным ряда исследователей [4, 5], являются стимулом апоптоза. На 1-е и 7-е сутки площадь, занимаемая СГ в ЕС1-клетках снижена на 50% и 60% ($p < 0,05$) соответственно. Большинство клеток находилось в дегранулированном состоянии. КГ в ЕС1-клетках снижался на 28% (1 сутки) и 35% (7 суток). Площадь митохондрий как в 1-й, так и во 2-й сериях экспериментальных групп снижена на 35% и 40% соответственно. В поздние сроки исследования (на 60 суток) для эндокриноцитов эпителия были характерны признаки, свидетельствующие об их высокой функциональной активности. Отмечается восстановление нормальной структуры ядрышек; увеличивается площадь эухроматина до $76,08 \pm 5,47$ мкм², при этом снижается содержание гетерохроматина. Последний расположен вдоль внутренней поверхности ядерной мембраны узкой полоской. Выявлялась интенсивная продукция секреторного материала в пластинчатом комплексе или в гранулярной эндоплазматической сети (рис. 1в). Наряду с этим отмечено интенсивное выведение из клетки секреторного материала путем растворения СГ и диффузии секрета через клеточную мембрану (рис. 1г). Об этом свидетельствует присутствие в клетках наряду с гранулами обычной электронной плотности гранул с пониженной электронной плотностью и изменение состояния мембраны гранул, электронная плотность которой заметно снижалась, а контуры теряли свою четкость и выглядели размытыми. Наблюдалось смещение их к плазмалемме (рис. 1б).

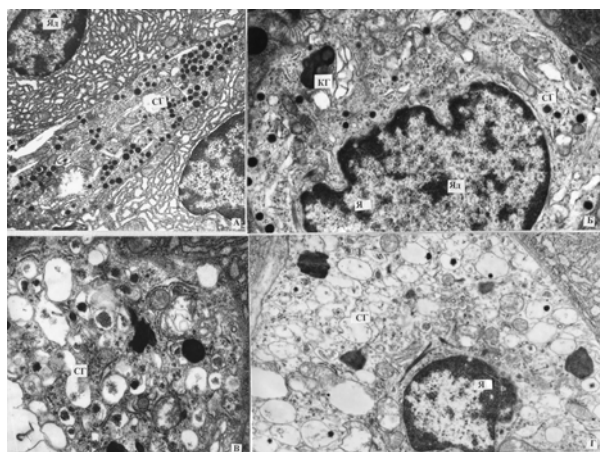


Рис. 1. Ультраструктура эндокриноцитов СОЖ крыс после ингаляции толуолом. А. ЕС-клетки (контроль); Б. незначительное количество СГ в цитоплазме ЕС-клеток (дегрануляция); В. фрагмент ЕС1-клетки (контроль); Г. Опустошенные секреторные гранулы ЕС1-клетки. УВ.16000.

По данным стереологического анализа параметры ядер ЕС-клеток СОЖ крыс в поздние сроки исследования (3, 4 серии) достоверно не отли-

чались от аналогичных показателей контроля. Однако, в ядре по-прежнему превалировал ГХ (рис. 1г). На 30-е сутки эксперимента площадь последнего характеризуется достоверным увеличением и равнялась $61,28 \pm 3,41$ мкм², в то время как в контроле – $41,68 \pm 3,41$ мкм², различие составляло 38% ($p < 0,05$) в сравнении с группой контрольных животных. В свою очередь, площадь ЭХ уменьшалась на 13%. Вектор соотношения площадей Гх и Эх – $0,88 \pm 0,06$ (против $0,52 = 0,04$ в контрольной группе) указывал на преобладание площади Гх над площадью Эх. Толщина маргинального хроматина увеличилась на 41%, до $0,76 \pm 0,03$ мкм, в группе интактных животных данный показатель составлял $0,54 \pm 0,02$ мкм ($p < 0,05$).

В поздние сроки эксперимента площадь, занимаемая СГ в ЕС-клетках, приближается к контрольным показателям. Площадь КГ при сроке исследования 30 и 60 суток составила $19,87 \pm 2,17$; $17,31 \pm 2,09$ соответственно. Общая площадь секреторных гранул ($78,37 \pm 3,48$ мкм²) достоверно не отличалась от показателя группы контрольных животных. Митохондрии продолговатой формы, с плотно упакованными кристами, занимали значительную часть цитоплазмы ЕС-клеток. Показатель общей площади митохондрий достоверно не отличался от группы интактных животных.

Следует отметить, что как в ранние, так и поздние сроки исследования, отмечается гетерогенность в реакции гастринпродуцирующих клеток по степени выраженности дезорганизации и нарушения структурной целостности секреторных гранул. Рядом с клетками с манифестными деструктивными процессами, затрагивающими преимущественно ядерный компартмент, выявляются клетки с относительно нормальной ультраструктурной организацией. Эти данные могут свидетельствовать о том, что действие толуола на структурную организацию апудоцитов может контролироваться на внутриклеточном уровне.

Ультраструктурный и морфометрический анализы указывали на дегрануляцию G-клеток, только на ранних сроках исследования. Об этом свидетельствовало: снижение общей площади секреторных гранул в цитоплазме, редукция и уменьшение площади комплекса Гольджи. Вблизи апикальной цитолеммы наблюдались картины экскреции. Иногда длинные цитоплазматические отростки эндокриноцитов распространялись вдоль эпителиальной базальной мембраны, осуществляя паракринную секрецию с доставкой регуляторных субстанций непосредственно к клеткам-мишеням, изредка проникая через базальную мембрану в подэпителиальное пространство. Особо следует отметить, что общая площадь секреторных гранул уменьшалась с $91,2 \pm 4,56$ мкм² до $41,7 \pm 2,67$ мкм² (1 сутки) и с $92,3 \pm 6,28$ мкм² до $38,06 \pm 4,21$ мкм² (7 суток). В целом, изменения нейроэндокринного аппарата СОЖ при ингаляции парами толуола следует считать дисрегуляторными.

Установлено, что независимо от срока исследования в ядрах гастринпродуцирующих клеток

происходило изменение соотношения площадей эухроматина и гетерохроматина в сторону увеличения последнего. Гетерохроматин располагался, как в центре, так и по периферии ядра.

Начиная с 30 суток после окончания интоксикации парами толуола, в G клетках, продуцирующих гастрин, наблюдалась разная степень ультраструктурных нарушений. В клетках с выраженными повреждениями обращали на себя внимание значительное расширение цистерн гранулярной сети и пластинчатого комплекса, появление просветленных, увеличенных в размерах митохондрий с частично поврежденными кристами. Электронно-микроскопическое исследование показало, что в гастринпродуцирующих клетках имеется неодинаковое число СГ и других цитоплазматических органелл, что отражает различные стадии функциональной деятельности G-клеток – от депонирования до активной секреции.

В зависимости от срока исследования: в ранние сроки после интоксикации парами толуола большинство ЕС-, G- и ЕС1-клеток находилось в дегранулированном состоянии, на что указывало уменьшение общей площади секреторных гранул и комплекса Гольджи. В поздние сроки эксперимента (30, 60 сутки) не отмечалось дегрануляции гастринпродуцирующих клеток и многие параметры ЕС- и ЕС1-клеток приближались к контрольным показателям. В целом, изменения нейроэндокринного аппарата СОЖ при ингаляции парами толуола следует считать дисрегенераторными.

Особенно нежелательна гибель эндокриноцитов СОЖ (ЕС- и ЕС1-клеток), вследствие чего происходит «несанкционированный» выброс большого количества биологически активных веществ, прежде всего серотонина и гистамина, а это вызывает многочисленные расстройства желудка, в том числе и толуол-индуцированных гастропатий.

Таким образом, в ранние сроки исследования на 1 и 7 сутки после 60 дневной затравки парами толуола, почти во всех изученных типах эндокринных клеток, присутствуют признаки дегрануляции. Кроме того, в отдельных эндокринных клетках выявляется экзоцитоз секреторных гранул, вследствие чего можно сделать вывод, что ингаляция толуолом не нарушает транспортных механизмов, участвующих в переносе секреторных гранул к базальной мембране клетки.

Результаты проведенных электронно-микроскопических исследований позволили подтвердить неодинаковую реакцию эндокриноцитов разного типа на токсическое воздействие паров толуола, что, по-видимому, может отражать и разную степень их участия в реализации эффектов ксенобиотика на желудок. Установлено, что эндокринные клетки реагируют на интоксикацию толуолом неспецифическими изменениями органелл общего назначения, при этом наряду с обычными формами секреции – молекулярной экструзией и экзоцитозом – в апудоцитах осуществляется выброс секреторных гранул путем его лизиса в многочисленных вакуолях (дегрануляция).

Полученные данные об изменениях в эндокринном аппарате желудка крыс при интоксикации толуолом показали, что он не остался толерантным к данному виду воздействия. Основываясь на литературных данных о сходстве реакции эндокриноцитов (увеличение их количества в большинстве случаев) при повреждении слизистой оболочки, вызванном различными заболеваниями органов ЖКТ [1, 2, 5] и на результатах полученных в собственных исследованиях, выявивших зависимость степени увеличения эндокринных клеток, их дегрануляции от степени повреждения эпителия СОЖ, можно предположить, что перестройка эндокриноцитов происходила не вследствие прямого действия толуола на эндокринные клетки, а в результате деструктивных изменений в эпителии, и направлена была на регуляцию местного гомеостаза с целью регенерации поврежденных воздействием ксенобиотиков структур. Полученные данные свидетельствуют о принципиально возможном и необходимом использовании методов морфологического исследования APUD – системы для оценки морфо-функционального состояния на разных стадиях гастропатий.

Перспективы дальнейших исследований.

Широкое применение различных токсикантов, ксенобиотиков как в промышленности так и быту, диктует необходимость дальнейшего изучения их влияния на клеточном и тканевом уровнях с целью выявления структурных изменений в различных экзо-эндокриноцитах желудка.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Патогенетические аспекты клинических вариантов синдрома раздраженного кишечника с позиций нарушения диффузной эндокринной системы и клеточного обновления колоноцитов / И.М. Кветной, М.А. Осадчук, А.В. Балашов, А.М. Осадчук // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. - 2008. -N 1.- С.38-44.
2. Роль диффузной эндокринной системы и клеточного гомеостаза эпителиоцитов слизистой оболочки желудка в возникновении и течении язвенной болезни двенадцатиперстной кишки / И.М. Кветной, М.А. Осадчук, А.М. Осадчук, Е.А. Исламова // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. - 2009.-N 4.- С.19-24.
3. Антихеликобактерные эффекты мелатонина / Н.К. Малиновская, С.И. Рапопорт, Н.И. Жернакова, С.Н. Рыбникова // Клин. мед. – 2007. – Т. 85, № 3. – С. 40–43.
4. Осадчук М.А. Диффузная нейроэндокринная система / М.А. Осадчук, В.Ф. Киричук, И.М. Кветной. – Саратов, 1996. – 110 с.
5. Патогенетические аспекты клинических вариантов синдрома раздраженного кишечника с позиций нарушения диффузной эндокринной системы и клеточного обновления колоноцитов / А.М. Осадчук, М.А. Осадчук, А.В. Балашов и др. // Рос. журн. гастроэнтерол. гепатол. колопроктол. – 2008. – Т. 18, № 1. – С. 52–58.
6. Bubenik G.A. Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance // Dig. Dis. Sci. – 2002. – Vol. 47, N 10. – P. 2336–2348.

Надійшла 02.12.2010 р.

Рецензент: проф. В.І.Лузін