

УДК 591.433:[615.277.3+615.3

© Федченко С.Н., Галузіна Л.О., 2011

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПОВРЕЖДЕНИЯ ЭПИТЕЛИЯ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИНГАЛЯЦИИ ТОЛУОЛОМ

Федченко С.Н., Галузіна Л.О.

ГЗ «Луганский государственный медицинский университет»

Федченко С.Н., Галузіна Л.О. Морфологические особенности повреждения эпителия слизистой оболочки желудка крыс при хронической ингаляции толуолом // Украинський морфологічний альманах. – 2011. – Том 9, № 4. – С. 127-130.

Одним из наиболее значимых гастротоксических эффектов толуола является его способность индуцировать гибель эпителиоцитов, вызывая атрофию СОЖ. Во всех сериях эксперимента сохраняется выраженная структурно-функциональная (фенотипическая) гетерогенность секреторных эпителиоцитов. Наиболее значительные ультраструктурные изменения эпителиоцитов выявлены в ранние сроки исследования. Таким образом, толуол можно отнести к факторам, вызывающим регенераторно-пластическую недостаточность эпителиоцитов СОЖ.

Ключевые слова: слизистая оболочка желудка, интоксикация толуолом

Федченко С.М., Галузіна Л.О. Морфологічні особливості пошкодження епітелію слизової оболонки шлунку щурів при хронічній інгаляції толуолом // Український морфологічний альманах. – 2011. – Том 9, № 4. – С. 127-130.

Одним з найбільш значимих гастротоксичних ефектів толуолу являється його здатність індукувати загибель епітеліоцитів, викликаючи атрофію слизової оболонки шлунку (СОШ). У всіх серіях експерименту зберігається виражена структурно-функціональна (фенотипова) гетерогенність секреторних епітеліоцитів. Найбільш значимі ультраструктурні зміни епітеліоцитів виявлені в ранні строки дослідження. Таким чином, толуол можна віднести до факторів, викликаючих регенераторно-пластичну недостатність епітеліоцитів шлунку

Ключові слова: слизова оболонка шлунка, інтоксикація толуолом

Fedchenko S.N., Galuzina L.O. Morphological characteristics of the damage of the epithelium of the mucous membrane of the stomach (MMS) Caused by Toluene Intoxication // Український морфологічний альманах. – 2011. – Том 9, № 4. – С. 127-130.

One of the most significant gastrototoxic effects of toluene is its ability to induce the death of epitheliocytes, causing atrophy of the mucous membrane of the stomach (MMS). In all series of the experiment remains evidently structural and functional (phenotypic) heterogeneity of secretory epitheliocytes. The toluene vapour changed the structure of the nuclear chromatin of most epithelial cells. Thus, toluene can be attributed to factors that cause regenerative-plastic insufficiency of stomach epitheliocytes

Key words: the mucous membrane of the stomach, intoxication caused by toluene

В настоящее время в понимании истинных механизмов образования гастропатий под влиянием различных вредных ксенобиотиков не существует единого мнения. Контаминация биологических сред химическими соединениями бензольного кольца (толуол и бензол) вызывает у людей нарушение функций различных органов, в том числе и органов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) [1,2]. Отсутствие четкого представления о причинных факторах, приводящих к возникновению поражений в условиях работы с ароматическими углеводородами послужило основанием для проведения гистологических и ультраструктурных исследований изменений клеток слизистой оболочки желудка (СОЖ) крыс при хронической ингаляции толуолом

Цель исследования: оценить с помощью комплексных морфологических и морфометрических методов с применением ультраструктурного анализа возможные изменения макроскопической картины, органо- и цитометрических показателей желудка крыс при хронической ингаляции толуолом.

Связь с научной темой: «Структурный гомеостаз тканей травного тракта, видільної системи та інтегруючих систем організму (ендокринної,

нервової та імунної), його регуляція та корекція змін, що виникають, в умовах дії екологічно небезпечних чинників» (№ державної реєстрації - 0109U004543).

Материал и методы. Исследование проведено на 48 крысах линии Вистар с исходной массой 150-180г. Крысы в специальной затравочной камере подвергались воздействию паров толуола (одного из компонентов эпоксидных 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), которых после завершения срока эксперимента 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, содержащихся в аналогичных условиях вивария. Эксперимент на животных выполняли в соответствии с правилами Европейской конвенции защиты позвоночных животных, использующихся в экспериментальных и других научных целях (European convention, 1986). Желудки извлекались, вскрывались по большой кривизне и промывались холодным физраствором. Затем макроскопически с

помощью лупы определялись число и площадь деструкций, которые дифференцировались на точечные (менее 1 мм), крупные (более 1 мм) и полосовидные. Устанавливали количество животных с поражением СОЖ, степень изъязвления (количество деструктивных изменений на одно животное) и индекс Паульса (ИП)- интегральный показатель масштабов деструкции в желудке, определяемый по формуле: $ИП = (\text{степень изъязвления} \times \text{процент животных с поражениями}) / 100$ [3]. Кроме того, подсчитывали в миллиметрах суммарную протяженность деструкций (точечных геморрагий, эрозий, полосовидных поражений СОЖ). Количественная характеристика железистых структур СОЖ проводилась по В.А.Самсонову [4]: среднее число эпителиальных клеток в продольном срезе главной железы; среднее число эпителиальных клеток в желудочной ямке; железисто-ямочный эпителиально-клеточный индекс (ЖЯЭИ -соотношение общего числа клеток в железе, к числу эпителиальных клеток в желудочной ямке); эпителиальная формула главной железы - процентное соотношение состава ее клеточных элементов (главных, обкладочных и слизистых клеток). Морфометрический анализ включал подсчет количества главных (ГК) и париетальных (ПК) клеток на единицу фундальных желез СОЖ; измерение толщины слизистой и подслизистой оболочек желудка, вычисляли подслизисто-слизистый индекс. Для изучения функциональной морфологии главных желез использовали индекс соотношения главных и париетальных клеток (индекс СППК). Для главных и париетальных клеток программа определяла следующие параметры: площадь ядра ($S_{я}$), площади гетерохроматина ($S_{гх}$) и эухроматина ($S_{эх}$), отношение площади гетерохроматина к площади эухроматина ($S_{гх}/S_{эх}$), толщину гетерохроматина ($L_{гх}$); общую площадь, занимаемую митохондриями в цитоплазме (S_m); площадь тубуловезикул ($S_{тв}$) и внутрисекреторных канальцев ($S_{ск}$).

Морфометрические данные экспортировались в программу Excel для дальнейшей статистической обработки и сохранения, достоверной считалась вероятная погрешность менее 5% ($p < 0,05$). Морфометрический анализ микроструктур гистологических препаратов проводили в 6 полях зрения тестовой площади на аппаратно-программном комплексе, состоящем из микроскопа «Olympus» – CX 31, с объективами Plan 10x /0,25, Plan 40 x /0,65 и Plan 100 x /1,25 Oil, цифровой видеокамеры «Olympus» - C 5050 ZOOM и компьютера Celeron(R) CPU 2,40 ГГц. Вычисляли среднюю арифметическую X (или p при альтернативной изменчивости), стандартную ошибку средней арифметической Sx, критерий значимости t для оценки достоверности различий между средними арифметическими (уровень значимости $p \leq 0,05$).

Результаты исследования. На тканевом уровне при ингаляции толуолом отмечаются следующие морфофункциональные изменения стенки желудка. Толщина СОЖ у животных 1-й и 2-й

опытных групп снижена на 20% ($p < 0,05$), в то время как толщина подслизистой основы желудка увеличена на 55% ($p < 0,05$) и 33% ($p < 0,05$) соответственно (рис. 1). Отсутствовала гистоархитектоника, присущая обычной слизистой оболочке и подслизистой основе желудка крыс.

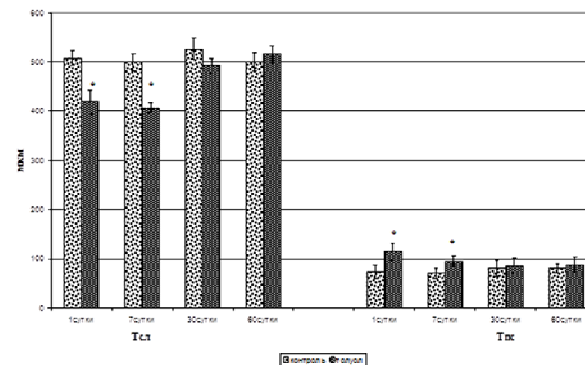


Рис. 1. Показатели толщины слизистой (Тсл) и подслизистой (Тпс) основы желудка крыс. Примечание: *показатели достоверности относительно контрольной группы ($p < 0,05$)

Подслизистая основа была неравномерно утолщена за счет отека и инфильтрации клеточными элементами, преимущественно нейтрофилами. На 1-е и 7-е сутки исследования подслизисто-слизистый индекс увеличился почти в 2 раза и составил $0,273 \pm 0,01$ и $0,231 \pm 0,04$, постоянным явлением было разрастание в подслизистой основе соединительной ткани разной степени зрелости.

Гистологическое исследование на светомикроскопическом уровне показало выраженные деструктивные изменения СОЖ крыс, подвергнутых ингаляции толуолом в течение 60 суток. В СОЖ крыс 1 и 2 серии обнаружено множество точечных и линейных (2-4 мм) геморрагических поражений. Независимо от сроков исследования наблюдалась десквамация поверхностного эпителия, потеря правильной ориентации железистыми трубочками, что указывало на деструктивный характер изменений в слизистой оболочке. На 1-е сутки количество эрозий, деструкций СО составило $10,05 \pm 1,94$, индекс Паульса $6,7 \pm 0,9$, а к 7-м суткам данный показатель составил $8,07 \pm 1,68$, индекс Паульса $-3,40 \pm 0,7$. Обращает внимание снижение количества добавочных и пещечных клеток в фундальной железе на 47% ($p < 0,05$) и 51% ($p < 0,05$) на 1-е сутки эксперимента. Такая же динамика сохранилась и на 7-е сутки исследования (Рис.2). Индекс ЖЯКИ был снижен до 2,12 (1-е сутки) до 2,20 (7-е сутки) против показателя 2,87 у интактных крыс. В ранние сроки эксперимента (1-е и 7-е) сутки имело место уменьшение количества ГК на 36% ($p < 0,05$) и 26% ($p < 0,05$) соответственно. Индекс соотношения главных и париетальных клеток (СППК) составил 1,14 (1 сутки) и 1,27 (7-е сутки). Значительным изменениям подвергались количественные характеристики и париетальных клеток (ПК). Так, в ранние сроки наблюдения выявили следующее: уменьшение их количества

на 30% до $15,21 \pm 1,17$ ($p < 0,05$) на единицу фундальных желез (1-е сутки) и на 25% (7-е сутки) ($p < 0,05$) в сравнении с контрольными показателями (Рис. 2). Особенностью действия толуола является снижение количества эпителиоцитов в желудочных железах на 38% ($p < 0,05$) и 32% в 1-й и 2-ой сериях эксперимента. Восстановление количества эпителиоцитов происходит лишь к 60-суткам.

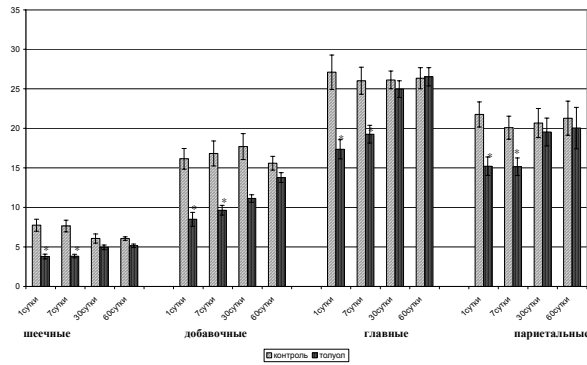


Рис. 2. Показатели количества эпителиоцитов в СОЖ крыс. Примечание: * показатели достоверности относительно контрольной группы ($p < 0,05$)

К 30-м и 60-м суткам эксперимента все цитоморфометрические показатели несколько сглаживаются и доходят практически до контрольных значений. На 60-е сутки после прекращения ингаляции парами толуола происходит выравнивание соотношения клеток и восстановление их популяции в фундальной железе желудка, архитектура СОЖ существенно не отличалась от таковой у контрольных животных. Собственная мышечная пластинка, мышечный и серозный слой – без видимых изменений. При ультраструктурном анализе в ПК определяется снижение площади мембран гранулярного эндоплазматического ретикулума, уплотнение матрикса митохондрий, отмечается снижение площади, занимаемой митохондриями на 37% ($p < 0,05$) и 34% ($p < 0,05$) в 1-й и 2-й сериях соответственно, с редукцией количества крист, увеличение числа крупных лизосом, повреждение и редукция органелл белкового синтеза. При ингаляции толуолом изменялась структура ядерного хроматина большинства как ГК так и ПК. Так, в ядрах ГК уменьшалась площадь, занимаемая Эх, увеличивалась площадь структур, занимаемых Гх на 42% и 69% соотношение Sгх к Sэх увеличилось в 2,3 и 2,8 раза в 1-й и 2-й сериях эксперимента, что может свидетельствовать о снижении синтетических процессов с участием ДНК. В ядрах ПК наблюдалась сходная картина: увеличение Sгх в 2 раза и значительное снижение Sэх на ранних сроках эксперимента. К самым ранним ультраструктурным изменениям относится реорганизация ядерного аппарата и особенно ядрышек. В ядрах секреторных эпителиоцитов наблюдался полиморфизм ядрышек – встречались как петлистые ядрышки с хорошо развитыми гранулярным и фибриллярным компонентами, так и ядрышки с явлениями сегрегации. В значительной части glanduloцитов с выраженной вакуолизацией ци-

топлазмы, в ядрах содержались ядрышки с сегрегированными гранулярным и фибриллярным компонентами и кольцевидно трансформированные ядрышки, что отражало регенераторно-пластическую недостаточность париетальных glanduloцитов. Последним были свойственны черты полностью дифференцированных, функционально незрелых glanduloцитов, что электронномикроскопически выражалось слабо развитыми структурами внутриклеточного канальца и низкой тубуловезикулярной активностью (Рис. 3).

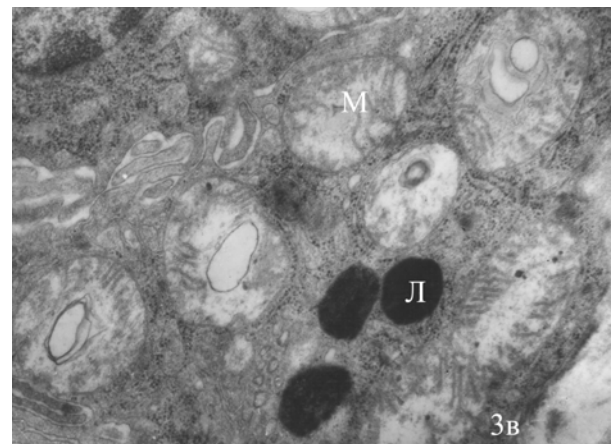
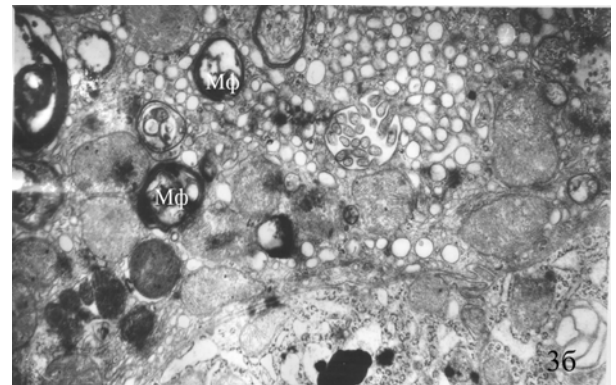
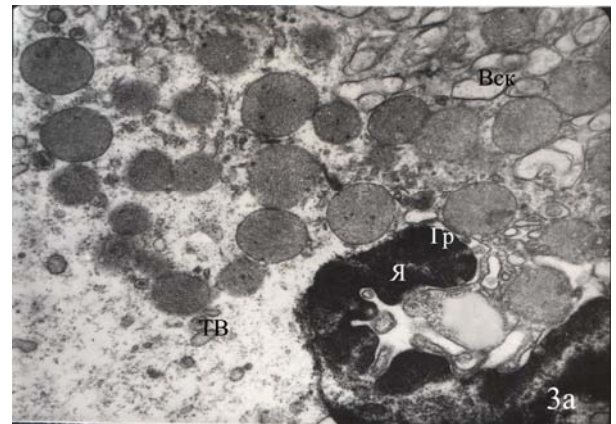


Рис.3. Ультраструктура ПК желудка крыс. а) Увеличена площадь ГХ, трансформированы ядрышки, слабо развиты внутрисекреторные канальцы (ВСК), незначительное количество тубуловезикул (ТВ). Ув. 28700. б) Формирование осmioфильных миелиноподобных фигур (МФ). Ув.27300. в) Просветление матрикса митохондрий (М), фрагментация крист, лизис цитоплазматический, увеличение лизосом (Л). Ув. 28000.

Начиная с 60-х суток наблюдения субмикроскопическая архитектура клеток СОЖ не отличается от таковой в группе контрольных экспериментальных животных. Нормализация субмикроскопической архитектуры эпителиоцитов СОЖ наступала к 60-м суткам. Особо следует отметить – общие признаки, присутствующие как в 1-й так и 2-й серии – наблюдалось усиление аутофагических процессов – формирование небольших остаточных телец, выраженные литические процессы ультраструктур [рис. 3б]. Ультраструктурные изменения ядер эпителиоцитов СОЖ крыс на 30-е сутки исследования были менее выраженными, чем описанные на 1-е и 7-е сутки исследования. Ядра как париетальных, так и главных glanduloцитов содержали в значительно большем количестве эухроматин, количество гетерохроматина было небольшим и приближалось к уровню контрольных величин.

Учитывая полученные данные толуол можно отнести к факторам, вызывающим регенераторно-пластическую недостаточность эпителиоцитов СОЖ. Следует отметить, что в условиях смоделированной патологии химической этиологии отмечается гетерогенность эпителиоцитов по степени выраженности дезорганизации нарушения структурной целостности. Ранее нами показано, что клетки ускоренно перемещаются из генеративной зоны и, не претерпев полноценной дифференциации, оказываются в тех местах, где обычно располагаются зрелые специализированные эпителиоциты [6, 7]. Результатом этого может стать ослабление функциональной способности клеток. Таким образом, структурными особенностями стенки желудка, возникающими вследствие токсического влияния толуола и способствующего формированию гастропатий являются утолщение подслизистой основы, снижение толщины СОЖ, уменьшение количества эпителиоцитов и перераспределение соотношения специализированных клеток, составляющих железу, увеличение инфильтрации межэпителиальных пространств и собственной пластинки. Одним из наиболее значимых гастротоксических эффектов толуола является его способность индуцировать гибель эпителиоцитов генеративной зоны слизистой оболочки, что в свою очередь вызывает атрофию СОЖ. Действие любого токсиканта в организме определяется характером его влияния на соответствующую « мишень». Такой « мишенью» в желудке для толуола является генеративная зона фундальной железы, где происходит постоянное деление клеток. Таким образом, эпителиальная формула (значительное уменьшение процентного содержания добавочных и пилорических, снижение париетальных и главных клеток), снижение железисто-клеточного эпителиально-клеточного индекса (уменьшение общего количества клеток в железе по отношению к клеткам в желудочных ямках) указывают на интенсивные деструктивные изменения в СОЖ. Последние связаны с нарушением слизееобра-

зующей функции желудка, а истончение СО и увеличение подслизисто - слизистого индекса указывают на атрофические процессы, развивающиеся к 60-м суткам эксперимента

Перспективы дальнейших исследований.

Предполагаем рассмотреть роль маркеров клеточного обновления (Ki-67) и апоптоза в возникновении нарушений клеточного гомеостаза эпителиоцитов желудка, а также определить прогностически значимую величину соотношения пролиферации к апоптозу эпителиоцитов желудка в плане возникновения и прогрессирования гастропатий желудка, ассоциированных с воздействием на организм паров толуола.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Baydas G. Melatonin protects the central nervous system of rats against toluene-containing thinner intoxication by reducing reactive gliosis / G. Baydas, R.J. Reiter, V. S. Nedzvetskii et al // *Toxicol. Lett.* - 2003. - V. 137, № 3. - P.169 – 174.2.
2. Gotohda T. Toluene inhalation induces glial cell line-derived neurotrophic factor, transforming growth factor and tumor necrosis factor in rat cerebellum / T. Gotohda, I. Tokunaga, S. Kubo et al // *Leg. Med. (Tokyo).* - 2002. - V. 4, № 1. - P. 21 – 28.
3. Pauls F.N. An assay method for anti-ulcer substances // *Gasroenterology.* – 1947. - 8 (6). - p. 774 - 782.
4. Самсонов В.А. Новые методы количественной оценки состояния железистого аппарата слизистой оболочки желудка // *Архив патологии.* – 1973.- т.35, вып.8. - С.79 - 82.
5. Успенский В.М. Функциональная морфология слизистой оболочки желудка. - Л.: Наука, 1986. - 291 с.
6. Федченко С.Н. Роль маркеров клеточного обновления (Ki-67) и апоптоза в возникновении и прогрессировании нарушений клеточного гомеостаза эпителиоцитов желудка, ассоциированных с воздействием на организм паров толуола / С.Н. Федченко, Л.О. Галузина // *Вісник проблем біології і медицини.* – 2011. – Вип. 2, № 2. – С. 272-274.
7. Федченко С.Н. Роль маркеров клеточного обновления (Ki - 67) и апоптоза в оценке нарушений клеточного гомеостаза желудка крыс под влиянием ксенобиотиков / С.Н. Федченко, Л.О. Галузина // *Перспективи медицини та біології, Луганськ.*- 2011.- Т. III, № 1 - С.41-43
8. Федченко С.Н. Морфогенез и гистостереологический анализ секреторных эпителиоцитов желудка с позиций нарушения диффузной эндокринной системы в условиях смоделированной патологии химической этиологии / С.Н. Федченко, Л.О. Галузина // *Український медичний альманах.* – 2011. – Т. 14, №3.- С.43-46.

Надійшла 14.10.2011 р.

Рецензент: проф. В.І.Лузін