

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СОСТОЯНИЯ ГЛАВНЫХ КЛЕТОК СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА КРЫС ПОСЛЕ СОВМЕСТНОГО ВВЕДЕНИЯ ЗОЛЕДРОНАТА И ГИДРОКОРТИЗОН АЦЕТАТА

Кондаурова А.Ю.

*Национальный медицинский университет А.А. Богомольца, Киев, Украина
anna.kondaurova@gmail.com*

Актуальность. Известны побочные эффекты бисфосфонатов, которые применяются в клинической практике. Они раздражают слизистую оболочку желудка и приводят к возникновению язвенных дефектов. Но недостаточны сведения об ультраструктурных изменениях в клетках слизистой оболочки желудка.

Цель – изучить влияние бисфосфоната 5-го поколения золедроновой кислоты и её комбинации с гидрокортизон ацетатом на структуру главных клеток слизистой оболочки желудка крыс в разные сроки введения.

Материалы и методы. Проведено морфометрическое исследование цитоплазмы главных клеток слизистой оболочки желудка крыс. Использованы электронномикроскопический и морфометрический методы.

Результаты. Независимо от срока эксперимента в цитоплазме главных клеток уменьшалась площадь секреторных гранул (как низкой, так и средней электронной плотности), на ранних сроках показатель площади секреторных гранул уменьшался на 23 % и 23% в сравнении с группой контроля, на поздних сроках эксперимента – на 86 % и 89 %, соответственно. Комплекс Гольджи занимал незначительную площадь в цитоплазме главных клеток и состоял из плотно упакованных цистерн, окруженных небольшим количеством микропузырьков. Зрелые секреторные гранулы отсутствовали. На 30 сутки после введения комбинации препаратов в главных клетках наблюдались признаки набухания митохондрий в цитоплазме, было увеличено количество лизосом. Снижалось количество крист в митохондриях, нарушалась их правильная ориентация. Деструктивные изменения в главных клетках достигали максимальной выраженности на 90 сутки эксперимента. Общая площадь митохондрий в цитоплазме уменьшалась на ранних и поздних сроках эксперимента на 30 % и 62 %, соответственно.

Выводы. Независимо от срока совместного введения гидрокортизона и золедроната, главные glanduloциты находились в пониженном функциональном состоянии, на это указывало: уменьшение общей площади секреторных гранул как средней, так и низкой электронной плотности, уменьшение площади комплекса Гольджи, редукция профилей эндоплазматической сети.

Ключевые слова: митохондрия, комплекс Гольджи, секреторные гранулы.

Препараты группы бисфосфонатов широко применяются в клинической практике. Однако при их применении отмечались побочные эффекты со стороны различных органов и систем, в том числе со стороны желудочно-кишечного тракта [1, 2, 3, 5]. Ризедронат, аледронат и др. раздражают слизистую оболочку желудка и предрасполагают к возникновению язвенных дефектов, что неоднократно подтверждалось в эксперименте на животных. Несмотря на многочисленные клинические исследования данной группы препаратов, в доступной литературе мало сведений об изменениях, происходящих на ультраструктурном уровне клеток слизистой оболочки желудка (СОЖ), не проводилось морфометрическое исследование glanduloцитов СОЖ. Все это обуславливает актуальность изучения процессов, происходящих на субклеточном уровне в главных клетках СОЖ.

Цель настоящего исследования – изучить влияние бисфосфоната 5-го поколения золедроновой кислоты и её комбинации с гидрокортизон ацетатом

на структуру главных клеток СОЖ крыс в разные сроки введения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент проведен на 125 белых половозрелых крысах-самцах массой 200-250 г. В зависимости от действующих агентов животных разделили на три группы. Первую группу (n=32) составили крысы, получавшие внутривентриально золедроновую кислоту. Вторую группу (n=31) составили крысы, получавшие гидрокортизон в чистом виде. Крысы, которые получали золедроновую кислоту в комбинации с гидрокортизоном, составили третью группу (n=32). Контрольные животные, получавшие физиологический раствор хлорида натрия – четвертую группу (n=30). По срокам наблюдения все животные каждой группы были распределены на 30 и 90 суток.

Крысы первой группы получали препарат, который относится к 5 поколению бисфосфонатов, «Зомета» (золедроновая кислота) производства *Novartis*

Рецензент: проф. Хайтович М.В.

Pharma AG, Basel, Switzerland (регистрационный номер в Украине № P.06.01./03.164, серийный номер 993 931.44-983/20 es). Препарат вводился 1 раз в 30 суток в дозе 0,362 мг/кг массы тела. Крысы второй группы получали гидрокортизон. В эксперименте применялась стандартная ампулярная 2,5 % суспензия гидрокортизона (серия №1720403 производства ВАТ «Фармак», г. Киев, регистрационный номер Р № UA/3288/01/01). Гидрокортизон вводился внутримышечно один раз в неделю в течение 30 суток в дозе 5,443 мг/кг. Крысы третьей группы получали золедоновую кислоту в комбинации с гидрокортизоном ацетатом. Препараты вводились по схемам, описанным выше. Животным четвертой группы вводили внутривентриально эквивалентное по объему количеству физиологического раствора.

Крыс содержали в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей. По истечении сроков эксперимента эвтаназию животных осуществляли путем декапитации под эфирным наркозом.

Для электронно-микроскопического исследования кусочки фундального и пилорического отделов слизистой оболочки желудка размером 1 мм³ погружали вначале в глутаральдегидный фиксатор, по методике Тарановского, на 24 часа. Потом – в 1 % тетраоксид осмия, по методике Палады, на 1 час. После дегидратации в этаноле возрастающей концентрации и абсолютном ацетоне, материал заливали смесью эпоксидных смол (эпон-аралдит). Полимеризацию проводили в течение 36 часов при 60°C. Ультратонкие срезы изготавливали на ультрамикротоме УМТП-4 Сумского производственного объединения «Электрон» (Украина), контрастировали в растворе уранилацетата и цитрате свинца, по методике Рейнольдса, и просматривали в электронном микроскопе ЭМ-125 того же объединения при ускоряющем напряжении 75 кВ. Изучаемый материал документировали в виде негативных и позитивных фотоотпечатков.

Для главных клеток определяли: общую площадь секреторных гранул низкой электронной плотности (S_{гнп}), общую площадь секреторных гранул средней электронной плотности (S_{гсп}), площадь комплекса Гольджи (S_{кг}), общую площадь митохондрии в цитоплазме (S_м).

Цифровые изображения электронных микрофотографий записывали на CD-диски, потом их обрабатывали с помощью программы «*Morpholog*», разработанного на кафедре нормальной анатомии Луганского государственного медицинского университета [4]. Морфометрические данные экспортировались в программу Excel для дальнейшей статистической обработки и хранения, достоверной считалась вероятная погрешность менее 5 % (p<0,05).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Независимо от срока эксперимента, в цитоплазме главных клеток происходило снижение площади секреторных гранул, как низкой, так и средней электронной плотности (рис. 1).

Так, общая площадь секреторных гранул низкой электронной плотности на 30 сутки эксперимента составляла 184,2±6,7 мкм², в группе контрольных животных – 239,91±8,49 мкм², отличие составило 23 % (p<0,05) по отношению к группе животных, получавших гидрокортизон – 32 % (p<0,05).

Общая площадь гранул средней электронной плотности при введении гидрокортизона в комбинации с золедоновой кислотой на 30 сутки равнялась 156,13±7,63 мкм², это соответствовало понижению на 49 % (p<0,05) по отношению к контролю и на 57 % (p<0,05) по отношению к крысам, получавшим гидрокортизон в чистом виде (рис. 1).

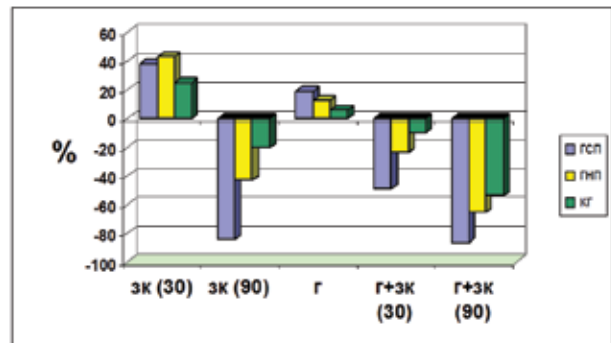


Рис. 1. Изменение общей площади секреторных гранул средней (ГСП) и низкой (ГНП) электронной плотности, площади комплекса Гольджи (КГ) в цитоплазме главных клеток при различных схемах и сроках (30 и 90 суток) введения гидрокортизона (Г) и золедоновой кислоты (ЗК).

Комплекс Гольджи занимал незначительную часть цитоплазмы главных клеток, состоял из плотно упакованных цистерн, окруженных небольшим количеством микропузырьков. В его области отсутствовали зрелые секреторные гранулы. Общая площадь комплекса Гольджи достоверно не отличалась от показателей контроля, равнялась 14,9±1,6 мкм² (табл. 1). В большей части главных glanduloцитов отмечена редукция профилей гранулярной и агранулярной эндоплазматической сети.

На 30 сутки после введения препаратов во многих главных glanduloцитах наблюдались митохондрии с признаками набухания, в цитоплазме увеличивалось число лизосом. Количество крист уменьшено, нарушена их правильная ориентация. Общая площадь митохондрий в цитоплазме главных клеток равнялась 100,64±4,58 мкм², в сравнении с аналогичными показателями из группы контроля и

Таблица 1

Морфометрические показатели ультраструктуры главных glanduloцитов СОЖ половозрелых крыс, получавших гидрокортизон в комбинации с золедроновой кислотой

Показатели	Сроки эксперимента			
	контроль	30 суток	контроль	90 суток
S _м , мкм ²	143,49±7,06	100,64±4,58*#	140,98±12,3	54,27±4,63*#
S _{гсп} , мкм ²	304,47±6,5	156,13±7,63*#	302,46±10,9	41,67±2,1*#
S _{гнп} , мкм ²	239,91±8,49	184,2±6,7*#	237,97±8,5	82,7±2,86*#
S _{кг} , мкм ²	16,47±2,37	14,9±1,6	15,84±3,8	7,68±0,94*#

Примечание: * - p<0,05 в сравнении с контролем, # - p<0,05 в сравнении с группой, получавшей гидрокортизон.

из группы животных, получавших гидрокортизон, это соответствовало понижению на 30 % и 26 %, соответственно (p<0,05) (табл. 1).

Деструктивные изменения в главных glanduloцитах достигают максимальной степени выраженности при введении гидрокортизона совместно с золедроновой кислотой на 90 сутки эксперимента.

В цитоплазме главных glanduloцитов содержится мало секреторного материала. Ультраструктурный и морфометрический анализы на 90 сутки эксперимента показали уменьшение в цитоплазме главных клеток площади, занимаемой секреторными гранулами как средней, так и низкой электронной плотности до 41,67±2,1 мкм² и 82,7±2,86 мкм², соответственно. Общая площадь секреторных гранул средней электронной плотности, в сравнении с группой контроля и животных, получавших гидрокортизон, уменьшалась на 86 % (p<0,05) и 89 % (p<0,05); общая площадь гранул низкой электронной плотности – на 65 % (p<0,05) и 69 % (p<0,05), соответственно. Одновременно с изменениями общей площади секреторных гранул наблюдалось расширение профилей эндоплазматической сети, вакуолизация ее канальцев, в которых видно вещество умеренной электронной плотности. Общая площадь, занимаемая комплексом Гольджи в цитоплазме (7,68±0,94 мкм²), по отношению к группе контрольных животных уменьшалась на 53 % (p<0,05), в сравнении с аналогичным показателем группы, получавшей гидрокортизон – на 56 % (p<0,05) (рис. 1).

Число митохондрий в цитоплазме уменьшено. Митохондрии структурно-неполноценные с очаговым просветлением матрикса, уменьшенным количеством крист. Нарушена структурная организация крист. Общая площадь митохондрий 54,27±4,63 мкм², в то время как в группе интактных животных 143,49±7,06 мкм², разница составляла 62 % (p<0,05); аналогичный показатель в группе животных, получавших гидрокортизон в чистом виде, равнялся 135,8±9,34 мкм², отличался на 60 % (p<0,05).

В цитоплазме многих главных клеток обнаруживаются в большом количестве миелоноподобные фигуры, крупные аутофагосомы.

Значительно увеличивается число лизосом. Некоторые лизосомы находились в контакте с мито-

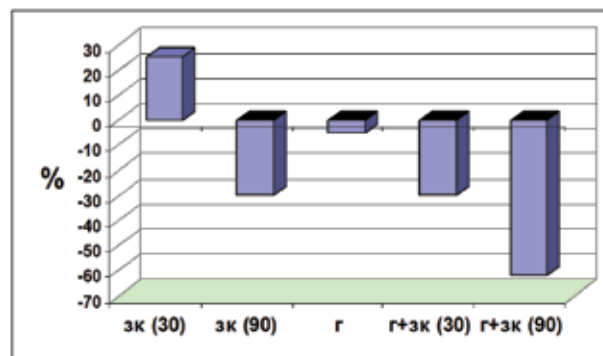


Рис. 2. Изменение общей площади митохондрий в цитоплазме главных клеток при различных схемах и сроках (30 и 90 суток) введения гидрокортизона (Г) и золедроновой кислоты (ЗК).

хондриями. Отмечена дестабилизация мембран лизосом, вследствие чего, возможно, происходила активация лизосомальных ферментов. В конечном итоге, это приводило к повсеместному разрушению наружных мембран митохондрий. Отмечалось образование конгломератов из митохондрий и других органелл.

Ультраструктурный и морфометрический анализы позволили определить, что, независимо от срока совместного введения гидрокортизона и золедроновой кислоты, главные glanduloциты находились в пониженном функциональном состоянии, на это указывало: уменьшение общей площади секреторных гранул как средней, так и низкой электронной плотности, уменьшение площади комплекса Гольджи, редукция профилей эндоплазматической сети. На 90 сутки после введения препаратов многие главные glanduloциты были деструктивно изменены, об этом свидетельствовали: дезорганизация крист и просветление матрикса митохондрий с уменьшением их общей площади, увеличение числа лизосом, дестабилизация лизосомальных мембран.

ВЫВОДЫ

Независимо от срока совместного введения гидрокортизона и золедроната, главные glanduloциты находились в пониженном функциональном состоянии, на это указывало: уменьшение общей площа-

ди секреторных гранул как средней, так и низкой электронной плотности, уменьшение площади комплекса Гольджи, редукция профилей эндоплазматической сети.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють, що не мають конфлікту інтересів, який може сприйматися таким, що може завдати шкоди неупередженості статті.

Джерела фінансування. Ця стаття не отримала фінансової підтримки від державної, громадської або комерційної організації.

ЛИТЕРАТУРА

1. Взаимосвязь протеолитических и морфологических изменений слизистой оболочки при экспериментальной язве желудка [Текст] / Л.В. Анисимова, А.В. Кубышкин, П.Ф. Семенец и др. // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2011. – Т. 1, № 1. – С. 8-12.
2. Зак М.Ю. Вплив токсигенних штамів *H. Pylori* на морфологічні зміни в слизовій оболонці шлунка у пацієнтів з хронічним атрофічним гастритом [Текст] / М.Ю. Зак // Сучасна гастроентерологія. – 2010. – № 5 (55). – С. 37-42.
3. Леонтьева Н.И. Морфологические изменения слизистой оболочки антрального и фундального отделов желудка при хеликобактерном гастрите [Текст] / Н.И. Леонтьева // – Морфологические ведомости. – 2011. – № 2. – С. 66-72.
4. Овчаренко В.В., Маврич В.В. Комп'ютерна програма для морфометричних досліджень «Morphology» [Текст] / Свідоцтво про реєстрацію авторського права на твір № 9604 Україна, дата реєстрації 19.03.2004
5. Фадеенко Г.Д. Лекарственные поражения желудка [Текст] / Г.Д. Фадеенко // Здоров'я України. – 2012. – № 3. – С.14-16

Отримано: 07.04.15.

МОРФОМЕТРИЧНИЙ АНАЛІЗ СТАНУ ГОЛОВНИХ КЛІТИН СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКУ ЩУРІВ ПІСЛЯ СПІЛЬНОГО ВВЕДЕННЯ ЗОЛЕДРОНАТУ І ГІДРОКОРТИЗОН АЦЕТАТУ

Кондаурова Г.Ю.

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ, Україна

Актуальність. Відомі побічні ефекти бісфосфонатів, які застосовуються в клінічній практиці. Вони подразнюють слизову оболонку шлунку і призводять до виникнення виразкових дефектів. Але недостатні відомості про ультраструктурні зміни в клітинах слизової оболонки шлунку.

Мета: дослідити вплив бісфосфоната 5-го покоління золедронові кислоти та її комбінації з гідрокортизоном ацетатом на структуру головних клітин слизової оболонки шлунку щурів у різні терміни введення.

Матеріали і методи. Проведено морфометричне дослідження цитоплазми головних клітин слизової оболонки шлунка щурів. Використані електронномікроскопічний і морфометричний методи.

Результати. Незалежно від терміну експерименту, в цитоплазмі головних клітин зменшувалася площа секреторних гранул (як низької, так і середньої електронної щільності). Комплекс Гольджи займав незначну площу в цитоплазмі головних клітин і складався з щільно упакованих цистерн, оточених невеликою кількістю мікропухирців. Зрілі секреторні гранули відсутні. На 30 добу після введення комбінації препаратів в головних клітинах спостерігалися ознаки набухання мітохондрій в цитоплазмі, була збільшено кількість лізосом. Знижувалася кількість крист в мітохондріях, порушувалася їх правильна орієнтація. Деструктивні зміни в головних клітинах досягали максимальної вираженості на 90 добу експерименту.

Висновок. Незалежно від терміну спільного введення гідрокортизону і золедронату, головні гландулоцити перебували в зниженому функціональному стані, на це вказувало: зменшення загальної площі секреторних гранул як середньої, так і низької електронної щільності, зменшення площі комплексу Гольджи, редукція профілів ендоплазматичної сітки.

Ключові слова: мітохондрія, комплекс Гольджи, секреторні гранули.

**MORPHOMETRIC ANALYSIS CONDITION OF THE CHIEF CELLS
OF RATS GASTRIC MUCOSA AFTER CO-ADMINISTRATION OF ZOLEDRONIC ACID
HYDROCORTISONE ACETATE**

Kondaurova A. Yu.

O.O. Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

Actuality. The side effects of bisphosphonates used in clinical practice are well known; they irritate the gastric mucosa and result in ulcer defects. However, there are still not enough data concerning the ultrastructural changes in the gastric mucosa cells.

Aim: to study the effect of zoledronic acid (5th generation bisphosphonate) and its combination with hydrocortisone acetate on the structure of the chief cells of the rats gastric mucosa at different periods of administration.

Material and methods. We have conducted the morphometric study of the chief cells cytoplasm of the rats gastric mucosa. We have used the methods of electron microscopy and morphometry.

Results. The area of secretory granules (both low and medium electron density) decreased in the chief cells cytoplasm irrespective of the experiment term; in the early stages the area of secretory granules ratio decreased by 23% and 23% compared to the control group, in the later stages of the experiment – 86% and 89% respectively. The Golgi complex occupied an insignificant part of the chief cells cytoplasm and consisted of densely packed cisterns surrounded by a small number of microbubbles. Mature secretory granules were absent. On the 30th day after the drug combination administration, the chief cells presented the signs of mitochondria swelling in the cytoplasm and increased number of lysosomes. The number of mitochondria cristae decreased and their correct orientation was impaired. The destructive changes in chief cell reached their maximum degree on the 90th day of the experiment. The total area of mitochondria in the cytoplasm decreased in the early and later stages of the experiment by 30 % and 62 % respectively.

Conclusion. Independently on the term of hydrocortisone and zoledronic acid co-administration, we observed the reduced functional state of the chief cells indicated by decreased total area of the secretory granules of both medium and low electron density, decreased area of the Golgi complex, and reduction of the endoplasmic reticulum profiles.

Key words: mitochondria, the Golgi apparatus, secretory granules.