

**СТРУКТУРНО-ЦИТОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЖЕЛУДКА 15-СУТОЧНЫХ КРЫС, ПОЛУЧЕННЫХ ОТ СПАРИВАЕМЫХ САМОК С САМЦАМИ, РАЗВИВАВШИХСЯ В УСЛОВИЯХ ХОЛЕСТАЗА У МАТЕРИ****© Мацюк Я.Р., Федина Е.М., Михальчук Е.Ч.***УО «Гродненский государственный медицинский университет», Республика Беларусь, 230009, ул. Горького, 80**Резюме*

**Цель.** Изучить особенности структурно-цитохимических свойств желудка 15-суточных крысят, полученных от спаривания животных, развивавшихся в условиях холестаза матери, экспериментально моделируемого на 17-е сутки беременности.

**Методы.** Научная работа выполнена на 15 беспородных белых крысах 15-суточного возраста (8 из которых получены при спаривании самцов и самок, развивавшихся в условиях холестаза, экспериментально моделируемого на 17-е сутки беременности (опыт), а 7 крыс получены от интактных животных (контроль)). В работе использовали хирургический, гистологический, цитохимический, морфо- и цитофотометрический, статистический методы исследования. Полученные данные обрабатывали методами параметрической статистики.

**Результаты.** Установлено, что у 15-суточных крысят второго поколения, полученного от спаривания самцов и самок, родившихся в условиях холестаза, происходит задержка развития оболочек желудка, особенно слизистой, уменьшение в последней не только численности собственных желез, но и количественного и качественного состава в них экзокриноцитов, сопровождающихся структурными и цитохимическими изменениями данных клеток.

**Заключение.** Экспериментально установлено, что у крыс второго поколения, полученного от спаривания самок и самцов, развивавшихся в условиях холестаза (первое поколение), в желудке наблюдаются существенные морфофункциональные изменения.

*Ключевые слова:* потомство, холестаз, желудок, собственные железы, экзокриноциты

**STRUCTURAL AND CYTOCHEMICAL FEATURES OF THE STOMACH OF 15-DAY-OLD RATS OBTAINED FROM MATING OF FEMALES WITH MALES THAT DEVELOPED IN CONDITIONS OF MATERNAL CHOLESTASIS****Matsyuk Ya.R., Phedina E.M., Mikhalchuk E.Ch.***Grodno State Medical University, 80, Gor'kogo St., 230009, Grodno, Republic of Belarus**Abstract*

**Objective.** To study the structural and cytochemical properties of the stomach of 15-day-old rats obtained from mating animals that developed under conditions of maternal cholestasis, experimentally modeled on the 17th day of pregnancy.

**Methods.** The scientific work was performed on the 15-day-old offspring of outbred white rats (15 animals, 8 of which were obtained by mating of males with females that developed in conditions of cholestasis, experimentally modeled on the 17th day of pregnancy (experimental group), and 7 rats were obtained from intact animals (control group)). In the study we used surgical, histological, cytochemical, morpho- and cytophotometric, statistical research methods. The obtained data were processed by parametric statistics.

**Results.** It was established that in 15-day-old second-generation rats obtained by mating of males with females born under conditions of cholestasis, there is a delay in the development of the stomach membranes, especially of the mucosa; a decrease of the number of proper glands in the mucosa, a decrease of the quantitative and qualitative composition of exocrinocytes in the proper glands, accompanied by structural and cytochemical changes of these cells.

**Conclusion.** It was experimentally established that in rats of the second generation, obtained from mating of females and males born under conditions of cholestasis (first generation), significant morphofunctional changes develop in the stomach.

**Keywords:** offspring, cholestasis, stomach, proper glands, exocrinocytes

## Введение

Экспериментально установлено, что у потомства крыс второго поколения, полученного от самцов или самок, развивавшихся в условиях холестаза у матери (первое поколение), при спаривании их с обычными животными в желудке развиваются, в основном, идентичные структурные и цитохимические изменения: задерживается развитие оболочек стенки органа, особенно слизистой, формирование в ней собственных желез. При этом нарушение в железах не только количественного, но и качественного состава экзокриноцитов сопровождается изменением их структурных и цитохимических свойств [2-4]. Однако характер изменений в органах крыс второго поколения, полученного при скрещивании самцов и самок, развивавшихся в условиях холестаза, до настоящего времени не изучен. Полученные данные будут иметь не только научную, но также практическую и социальную значимость.

В связи с этим, целью исследования явилось изучение особенностей морфофункциональных свойств желудка у 15-дневных крыс, родившихся при спаривании животных, развивавшихся в условиях экспериментально моделируемого холестаза матери [1].

## Методика

Исследования проведены на 15 крысятах 15-суточного возраста, 8 из которых получены при спаривании самцов и самок, развивавшихся в условиях холестаза, экспериментально моделируемого на 17-е сутки беременности (опыт). Остальные 7 крысят получены от интактных животных (контроль). Животные опытной и контрольной групп содержались в стандартных условиях вивария. Эксперимент проводился в соответствии с принципами биоэтики и требованиями Директивы Европейского Парламента и Совета № 2010/63/EU от 22.09.2010 о защите животных, используемых для научных целей [6].

По достижению 15-суточного возраста крысят взвешивали и после выдерживания на 15-часовой голодной диете умерщвляли в парах эфира с последующей декапитацией. После лапаротомии извлекали желудок и проводили забор образцов из одних и тех же мест его донной области. Одни кусочки взятого материала после фиксации в жидкости Карнуа заключали в парафин по принципу «контроль-опыт». Изготовленные на микроскопе «Leica RM 2125» одномоментно из материала опытных и контрольных животных парафиновые срезы толщиной 5 мкм после окрашивания гематоксилином и эозином использовали для гистологических и морфометрических исследований, а толщиной 10 мкм – для гистохимических: определяли в слизепroduцирующих клетках содержание гликопротеинов по Шабдашу, сульфо- и сиаломуцинов по Спайсеру при обработке альциановым синим при pH 1,0 и 2,5, соответственно, и рибонуклеопротеинов по Эйнарсону [5].

Другие кусочки взятого материала после замораживания в жидком азоте монтировали на объектодержатели криостата фирмы Leica CM 1850 при  $-15^{\circ}\text{C}$  по аналогичному принципу «контроль-опыт». Криостатные срезы толщиной 10 мкм использовались для определения в экзокриноцитах желудка активности дегидрогеназ сукцината (СДГ), лактата (ЛДГ), восстановленного НАД (НАДН-ДГ) и кислой фосфатазы (КФ). Количественную оценку активности проводили, определяя оптическую плотность полученного осадка хромогена в цитоплазме клеток на максимуме поглощения окрашенных продуктов реакций. Относительную активность ферментов или содержание вещества выражали в единицах оптической плотности (ед. опт. пл.). Изучение готовых препаратов на светооптическом уровне, их микрофотографирование и количественную оценку активности ферментов проводили при помощи микроскопа Axioscop 2 plus (Carl Zeiss, Германия), цифровой видеокамеры Leica DFC 320 (Leica Microsystems GmbH, Германия) и программы компьютерного анализа изображения Image Warp (Bit Flow, США).

Полученные цифровые данные подвергали параметрической статистической обработке, используя пакет программ Statistica 6.0 для Windows (StatSoft, Inc., США, серийный номер 31415926535897). При проведении описательной статистики рассчитывали следующие показатели:  $M$  – средняя арифметическая,  $m$  – ошибка средней арифметической. Сравнение групп по одному признаку проводили с помощью  $t$ -критерия Стьюдента для независимых выборок. Различия между группами считали статистически значимыми, если вероятность ошибочной оценки не превышала 5% ( $p < 0,05$ ).

## Результаты исследования и их обсуждение

При вскрытии брюшной полости заметно, что размеры желудка у 15-суточных опытных (холестатических) крысят заметно меньше, нежели у контрольных. Притом слизистая оболочка у них не ровная, как в контроле, а образует многочисленные складки, вдающиеся в просвет желудка (рис. 1).

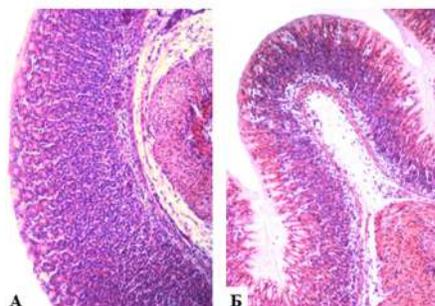


Рис. 1. Общий вид слизистой дна желудка контрольной (А) и опытной (холестатической) (Б) крысы. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 100

По данным морфометрии у опытной группы тоньше собственная пластинка слизистой, мышечная оболочка, особенно её циркулярный мышечный слой (табл. 1). В последней часто обнаруживаются «волны сокращения», что свидетельствует о повышенной функциональной активности мышечной оболочки, приводящей к уменьшению размера органа и образованию в нём многочисленных складок слизистой.

Таблица 1. Морфометрическая характеристика структуры желудка 15-дневных крысят, рожденных от животных, развивавшихся в условиях холестаза матери ( $M \pm m$ )

Показатели	15 сутки	
	контроль	опыт
Толщина собственной пластинки слизистой, мкм	176,7±1,2	153,6±3,0*
Число собственных желез (20×7)	25,6±0,6	23,3±1,2***
Число экзокриноцитов в железе	40,7±0,6	29,2±0,7*
Из них:		
париетальных	8,2±0,3	5,7±0,2*
главных	18,7±0,4	12,0±0,4
добавочных	Не определяются	
шеечных	8,2±0,4	10,9±0,4**
Митотически делящихся форм	1,1±0,1	0,3±0,1*
Мышечная оболочка:		
внутренний циркулярный слой, мкм	95,0±3,0	67,4±1,9*
наружный продольный слой, мкм	12,6±0,7	11,4±0,4

Примечание: \* –  $p=0,001$ , \*\* –  $p=0,01$ , \*\*\* –  $p=0,06$  при сравнении опытной группы с контролем

В слизистой желудка опытных крысят желудочные ямки более глубокие, чем у контрольных животных. В ней проявляется тенденция к уменьшению численности в поле зрения собственных желез, они и короче по длине, сужены, зачастую без выраженного просвета, напоминают тяж клеточных элементов, среди которых уменьшено число высокодифференцированных экзокриноцитов (париетальных, главных), а малодифференцированных (шеечных), наоборот, увеличено (табл. 1). Изменена структурная и цитохимическая характеристика экзокриноцитов. Поверхностно-ямочные эпителиоциты у опытной группы 15-суточных крысят, в отличие от контрольной группы (рис. 1А), набухшие, цитоплазма в базальном отделе зачастую подвержена микровакуолизации, а апикальные отделы переполнены мукоидным секретом (рис. 1Б). Содержание в последнем гликопротеинов (рис. 2А, Б) и сиаломуцинов (рис. 2В, Г) увеличено. Они постоянно выявлялись в комплексе Гольджи эпителиоцитов в виде мелких вновь синтезированных гранул, что свидетельствует о непрерывающемся синтезе мукополисахаридов у опытных 15-суточных крысят. Эти биополимеры, особенно гликопротеины, обнаруживались в малодифференцированных добавочных экзокриноцитах. Надо отметить, что гистологически в препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, у 15-суточных животных, даже контрольной

группы, отдифференцировать добавочные мукоциты от других малодифференцированных экзокриноцитов является проблематичным. Эти данные свидетельствуют о том, что мукоциты, проявляют уже функциональную активность, несмотря на недифференцированность. Активность СДГ, НАДН-ДГ в поверхностно-ямочных эпителиоцитах проявляет тенденцию к снижению, а активность ЛДГ и КФ, наоборот, возрастает (табл. 2).

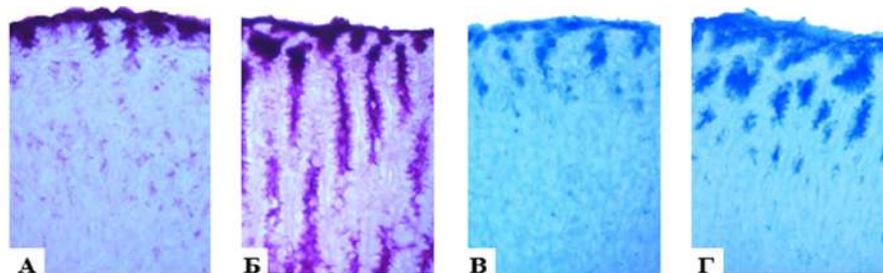


Рис. 2. Слизистая оболочка донного отдела желудка 15-суточного контрольного (А, В) и опытного (холестатического) (Б, Г) животных. А – содержание гликопротеинов, В – сиаломуцинов в слизистой контрольной крысы; Б – содержание гликопротеинов и Г – сиаломуцинов у животного, полученного от крыс, развивавшихся в условиях холестаза. А, Б – окраска по Шабадашу; В, Г – альциановым синим при рН 2,5 по Спайсеру. Ув. 200

Весьма незначительно в поверхностно-ямочных эпителиоцитах опытных животных увеличивается содержание сульфомуцинов. Они обнаруживаются и в секреторных гранулах тканевых базофилов, особенно находящихся в стадии депонирования. Надо отметить, что содержание гликопротеинов и сиаломуцинов в поверхностной слизи меньше, чем у животных контрольной группы. Это свидетельствует о нарушении в слизепroduцирующих экзокриноцитах опытных животных секреторного цикла: фаза синтеза мукополисахаридов существенно не уменьшается, а фаза экструзии тормозится.

Париетальные экзокриноциты, число которых в собственных железах у опытных животных снижено (табл. 1), отличаются выраженным полиморфизмом (преимущественно малых размеров), разной оксифильностью цитоплазмы и располагаются в одном ряду с главными экзокриноцитами. Цитоплазма некоторых париетальных экзокриноцитов, преимущественно расположенных в области шеек желез, подвержена микровакуолизации. Последняя, вероятно, представляет собой расширенные цистерны внутриклеточных секреторных канальцев, что характерно для активно функционирующих форм. Активность в них СДГ, НАДН-ДГ снижена, активность ЛДГ – не меняется, а активность КФ – увеличена.

Главные экзокриноциты у 15-суточных опытных крысят отличаются от таковых у контрольных малыми размерами, компактностью расположения в собственных железах и слабо выраженными базофильными свойствами. Секреторных гранул в апикальном отделе цитоплазмы крайне мало, поэтому, в отличие от животных контрольной группы, полярность цитоплазмы главных экзокриноцитов не отчетлива. Активность в цитоплазме СДГ, ЛДГ, НАДН-ДГ и КФ у опытных животных достоверно снижена (табл. 2). Уменьшено в цитоплазме главных экзокриноцитов и содержание рибонуклеопротеинов.

Таблица 2. Показатели активности ферментов в дифференцирующихся экзокриноцитах собственных желез желудка 15-суточных контрольных и опытных крысят по данным цитофотометрии (ед. опт. пл.) ( $M \pm m$ )

Ферменты		Поверхностно-ямочные эпителиоциты	Париетальные экзокриноциты	Главные экзокриноциты
СДГ	контроль	0,22±0,02	0,48±0,02	0,34±0,02
	опыт	0,19±0,02	0,39±0,02**	0,26±0,01*
ЛДГ	контроль	0,23±0,01	0,37±0,02	0,23±0,01
	опыт	0,28±0,04	0,37±0,02	0,14±0,01*
НАДН-ДГ	контроль	0,39±0,04	0,51±0,03	0,29±0,02
	опыт	0,16±0,02*	0,33±0,02*	0,17±0,01*
КФ	контроль	0,25±0,03	0,41±0,02	0,40±0,03
	опыт	0,33±0,02**	0,48±0,02	0,33±0,02***

Примечание: \* –  $p = 0,001$ ; \*\* –  $p = 0,003$ ; \*\*\* –  $p = 0,04$  при сравнении опытной группы с контролем

Добавочные клетки (мукоциты) на гистологических препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, как отмечалось выше, у 15-суточных животных, не только опытной группы, но и контрольной, отличить от других малодифференцированных клеток не представляется возможным. Однако у них уже проявляется способность к синтезу гликопротеинов и сиаломуцинов (рис. 2).

Число же щечных экзокриноцитов в собственных железах опытных животных, в отличие от контрольных, увеличено. Последнее свидетельствует о задержке их дифференцировки в другие экзокриноциты, что подтверждается снижением их количества в собственных железах. Они также проявляют у опытных животных увеличенную способность к синтезу гликопротеинов и сиаломуцинов (рис. 2Б, Г). Заметно уменьшалось среди экзокриноцитов и число митотически делящихся форм. В слизистой оболочке, особенно в подэпителиальном слое, сужены просветы кровеносных капилляров и поэтому на гистологических препаратах они выявляются с трудом.

## Заключение

Таким образом, установлено, что у 15-суточных крысят второго поколения, полученного от животных, развившихся в условиях холестаза у матери (первое поколение), происходит задержка развития оболочек стенки желудка, особенно слизистой, а в ней – собственных желез. В последних уменьшается не только число входящих в их состав экзокриноцитов, но изменяется их качественный состав: число париетальных и главных клеток уменьшается, а щечных, наоборот, возрастает. Активность в экзокриноцитах СДГ, НАДН-ДГ, содержание РНК проявляет тенденцию к снижению, активность ЛДГ, за исключением главных клеток, существенно не меняется, а активность КФ возрастает. Снижение их тинкториальных свойств сопровождается структурными нарушениями.

## Литература (references)

1. Кизиюкевич Л.С. Реактивные изменения в почках при экспериментальном холестазе. – Гродно: ГрГМУ, 2005. – 239 с. [Kiziukevich L.S. *Reaktivnye izmenenija v pochkah pri jeksperimentalnom holestaze*. Reactive changes in the kidney in experimental cholestasis. – Grodno: GrGMU, 2005. – 239 p. (in Russian)]
2. Мацюк Я.Р., Михальчук Е.Ч. Морфофункциональные особенности органов женской половой системы потомства белых крыс, родившихся от самок, развивавшихся в условиях холестаза матери // Гепатология и гастроэнтерология. – 2017. – Т.1, №2. – С. 170-174. [Matsyuk Ya.R., Michalchuk E.Ch. *Gepatologiya i gastroenterologiya*. Hepatology and gastroenterology. – 2017. – V.1, N2. – P. 170-174. (in Russian)]
3. Мацюк Я.Р., Михальчук Е.Ч. Морфофункциональные показатели желудка крыс второго поколения, родившихся от самок, развивавшихся в условиях холестаза матери // Гепатология и гастроэнтерология. – 2018. – Т.2, №1. – С. 80-85. [Matsyuk Ya.R., Michalchuk E.Ch. *Gepatologiya i gastroenterologiya*. Hepatology and gastroenterology. – 2018. – V.2, N1. – P. 80-85. (in Russian)]
4. Мацюк Я.Р., Михальчук Е.Ч. Особенности структурно-цитохимических свойств желудка взрослых крыс второго поколения, родившихся от самок, развивавшихся в условиях холестаза матери // Новости медико-биологических наук. – 2018. – Т.17, №1. – С. 37-41. [Matsyuk Ya.R., Michalchuk E.Ch. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk*. News of biomedical sciences. – 2018. – V.17, N1. – P. 37-41. (in Russian)]
5. Пирс Э. Гистохимия теоретическая и прикладная. – М.: Издательство иностранной литературы, 1962. – 962 с. [Pirs Je. *Gistohimija teoreticheskaja i prikladnaja*. Histochemistry theoretical and applied. – Moscow: Publisher of Foreign Literature, 1962. – 960 p. (in Russian)].
6. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes: text with EEA relevance 20.10.2010. – Strasbourg: Official Journal of the European Union, 2010. – 46 p.

## Информация об авторах

Мацюк Ярослав Романович – доктор биологических наук, профессор кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии УО «Гродненский государственный медицинский университет», Беларусь. E-mail: matsiuk39@mail.ru

Федина Екатерина Михайловна – кандидат биологических наук, доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии УО «Гродненский государственный медицинский университет», Беларусь. E-mail: phedina.katerina@mail.ru

Михальчук Елена Чеславовна – кандидат биологических наук, доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии УО «Гродненский государственный медицинский университет», Беларусь. E-mail: smzimatkina@mail.ru

**Конфликт интересов:** авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.