

УДК 612.112.93: 611.342]:616.36-008.811-092.9

Я. Р. МАЦЮК, Ю. Н. ЧЕРНЫШЕВИЧ

**ВОЗРАСТНЫЕ MORFOFUNKЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
ТКАНЕВЫХ БАЗОФИЛОВ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ДВЕНАДЦАТИПЕРСТНОЙ
КИШКИ КРЫСЯТ, РАЗВИВАВШИХСЯ В УСЛОВИЯХ ХОЛЕСТАЗА**

Гродненский государственный медицинский университет, Беларусь

(Поступила в редакцию 15.07.2013)

Введение. Тканевые базофилы – полифункциональные клетки рыхлой соединительной ткани, составляющие около 10 % ее клеточного состава. Они располагаются вдоль мелких кровеносных и лимфатических сосудов, вблизи эпителиальных пластов, секреторных клеток, миоцитов [1, 3, 7]. Тканевые базофилы весьма чувствительны к нервным и гормональным воздействиям, обеспечивают местный тканевой гомеостаз [2]. Кроме того, они играют большую роль в развитии адаптивных и компенсаторных механизмов [6], причастны к процессам пролиферации клеток и их функциональной активности [9].

Одной из особенностей тканевых базофилов является разнонаправленность действия выделяемых ими важных биологически активных веществ. Гистамин расширяет артериолы, увеличивает проницаемость капилляров, имеет непосредственное отношение к регуляции системы микроциркуляции, активирует внутрисосудистое тромбообразование [10]. Кроме того, он стимулирует процесс фагоцитоза, является одним из наиболее важных медиаторов воспаления. Гепарин, наоборот, ингибирует гистаминазу, проявляет антикоагулянтные свойства, снижает проницаемость капилляров. Он обладает способностью образовывать комплексы с белками, биогенными аминами, инактивирует лизосомальные ферменты, оказывает противовоспалительное действие, снижает проницаемость основного вещества, уменьшает эффект серотонина [5]. Гепарин тормозит пролиферацию клеток и проявление фагоцитарной активности [9]. Серотонин, который выявлен в тканевых базофилах грызунов, способствует пролиферации клеток в криптах тонкой кишки, прослеживается его связь с синтезом и секрецией гликозаминогликанов основного вещества, связь с секреторным процессом в слизепroduцирующих клетках, а также с функционированием гладких мышц [9]. Вообще, в тканевых базофилах содержится комплекс биологически активных веществ, имеющих непосредственное отношение не только к процессам развития органа, но и его функционирования.

Восполнение запасов биологически активных веществ в тканевых базофилах может идти путем поглощения их из окружающей среды или внутриклеточного синтеза. В первом случае тканевые базофилы «очищают» ткани от избытка биологически активных веществ [9].

Цель исследования – установить изменения морфофункциональных свойств тканевых базофилов в двенадцатиперстной кишке крысят, развивавшихся в условиях эндогенной интоксикации холестаза у матери, учитывая полифункциональность этих клеток, их высокую чувствительность к нервным и гормональным воздействиям.

Материалы и методы исследования. Исследования проведены на 48 крысятах 15-, 45-, 90-суточного возраста в соответствии с правилами, приведенными в Хельсинской Декларации о гуманном обращении с животными. Опытную группу составили 24 крысенка, родившихся от самок, которым на 17-е сутки беременности моделировали подпеченочный обтурационный холестаз путем наложения двойной лигатуры на общий желчный проток с последующей его перерезкой [4].

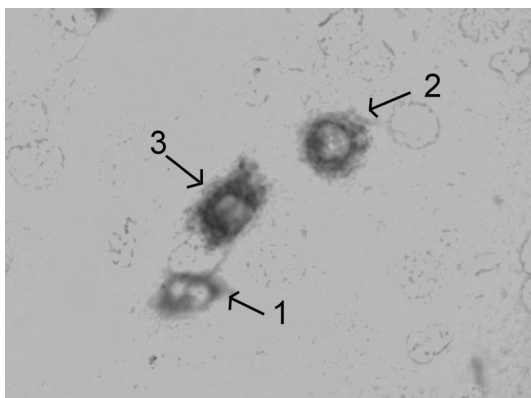


Рис. 1. Общий вид тканевых базофилов по насыщенности гранулами: 1 – в стадии полной дегрануляции; 2 – в стадии умеренной дегрануляции, 3 – в стадии депонирования гранул. Окраска альциановым синим при pH 1.0. $\times 40$ (об.), $\times 10$ (ок.)

тического индекса эпителиоцитов крипт. Срезы толщиной 10 мкм обрабатывали альциановым синим при pH 1.0 по Spicer [8] и с помощью микроскопа Axioskop 2 plus ($\times 400$), оснащенного цифровой камерой Leica DFC 320 (Германия), определяли локализацию и численную плотность тканевых базофилов на площади 200 мм^2 среза слизистой оболочки. Помимо этого, среди тканевых базофилов, выявленных на единицу площади слизистой, по насыщенности гранулами, как показано на рис. 1, определяли типологический профиль: подсчитывали количество дегранулированных форм (группа I), умеренно дегранулированных (II группа) и находящихся в стадии депонирования (III группа). Полученные при этом данные использовали для определения грануляционного индекса (ГИ) и индекса насыщения (ИН).

ГИ представляет собой сумму производных числа тканевых базофилов в каждой группе типологического профиля на номер группы. Он указывает на насыщенность гранулами тканевых базофилов в единице площади слизистой оболочки. ИН определяли путем деления ГИ на число тканевых базофилов в единице площади. ГИ показывает насыщенность гранулами тканевого базофила в контрольной и опытной группах.

Кроме того, на препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, в каждой экспериментальной группе подсчитывали в криптах общее число эпителиоцитов, а при окраске железным гематоксилином определяли число митотически делящихся форм среди них, а также митотический индекс (%).

Для морфометрических исследований использовали программу Image Warp (Bit Flow, США). Полученные цифровые данные обрабатывали методами непараметрической и параметрической статистики с помощью компьютерной программы Statistica 6.0 для Windows. При обработке данных с помощью непараметрической статистики использовали двусторонний непарный *U*-критерий Манна–Уитни. Данные представлены в виде *Me* (IQR), где *Me* – медиана, а IQR – интерквартильный размах. О достоверности различий при обработке данных с помощью параметрической статистики судили по *t*-критерию Стьюдента. Статистические данные представлены в виде $M \pm m$, где *M* – среднее арифметическое значение, *m* – стандартная ошибка. Результаты считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Результаты исследований показали, что крысята, родившиеся от самок с экспериментально вызванным холестазом, отличаются меньшей подвижностью, сниженной массой тела. Это согласуется с данными ранее проведенных исследований [11].

У 15-дневных крысят опытных групп стенка двенадцатиперстной кишки, как и ее слизистая, значительно тоньше, дряблая, непрочная, менее развиты ворсинки и крипты. При этом ворсинки отличаются полиморфизмом, а крипты короче, располагаются неупорядоченно и содержат меньшее число клеток. Выстилающие эпителиоциты меньшей высоты, а щеточная каемка, в отличие от таковой в контроле, просматривается с трудом. Цитоплазма эпителиоцитов подвержена зна-

В контрольную группу вошли 24 крысенка, родившиеся от матерей, которым в тот же срок беременности производили лишь лапаротомию. Все самки контрольных и опытных групп и родившиеся от них крысята содержались в одинаковых условиях вивария.

Крысят контрольной и опытной групп, достигших 15-, 45-, 90-суточного возраста, после осмотра и взвешивания выводили из опыта под легким эфирным наркозом с последующей декапитацией и забором начального отдела двенадцатиперстной кишки. Материал для гистологических исследований сразу после забора фиксировали в жидкости Карнуа, а затем заключали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм, окрашенные гематоксилином и эозином, использовали для проведения гистологических и морфометрических исследований, а окрашенные железным гематоксилином – для определения митотического индекса эпителиоцитов крипт.

чительной микровакуолизации, оксифильные свойства снижены. Клетки Панета, расположенные у основания крипт, приобретают вид мелкоклеточного многоядерного конгломерата с микровакуолизированной цитоплазмой. Меньшими размерами отличаются и экзокриноциты дуоденальных желез. Их цитоплазма, в основном в апикальном отделе, имеет пенистую структуру. Собственная пластинка слизистой в области ворсинок, межкриптных пространств слегка отечна, с наличием большого количества свойственных рыхлой соединительной ткани клеточных элементов: фибробластов, гистиоцитов, макрофагов и тканевых базофилов. Последние представляют собой клетки округлых или овальных форм, расположенные преимущественно вблизи кровеносных капилляров, эпителия ворсинок и крипт. Их количество в слизистой оболочке небольшое, но достоверно выше, чем в контроле (табл. 1). Однако среди них увеличено число не только депонирующих форм, но и клеток, находящихся в состоянии умеренной и полной дегрануляции. Последнее свидетельствует об увеличении их функциональной активности. ГИ значительно возрос. При этом ИН существенно не менялся. Просветы капилляров ворсинок и межкриптных пространств расширены, вследствие чего отмечается умеренная отечность (табл. 2). Число эпителиоцитов в крипте, как и среди них митотически делящихся форм, значительно меньше, чем в контроле (табл. 3).

Т а б л и ц а 1. **Возрастные морфометрические показатели тканевых базофилов (ТБ) в слизистой оболочке двенадцатиперстной кишки крысят контрольной и опытной (холестаза) групп (M ± m)**

Возраст крысят, сут	Группа	Количество ТБ в 200 мм ²	Типологический профиль ТБ			Грануляционный индекс ТБ	Индекс насыщения ТБ
			дегранулированные (I группа)	умеренно дегранулированные (II группа)	депонирующие (III группа)		
15	Контроль	2,3 ± 0,28	0,8 ± 0,1	1,23 ± 0,3	0,27 ± 0,11	4,07 ± 0,6	1,75 ± 0,09
	Холестаз	3,9 ± 0,5*	1,39 ± 0,21*	1,87 ± 0,27	0,64 ± 0,2	7,06 ± 1,05*	1,77 ± 0,08
45	Контроль	13,27 ± 2,69	5,78 ± 1,16	6,78 ± 1,58	0,71 ± 0,18	21,48 ± 4,54	1,62 ± 0,04
	Холестаз	27,76 ± 4,7*	12,35 ± 2,67*	13,41 ± 2,19*	1,36 ± 0,36	43,25 ± 4,8*	1,7 ± 0,23
90	Контроль	40,98 ± 4,59	15,6 ± 1,99	18,96 ± 2,27	6,42 ± 1,63	72,79 ± 9,46	1,76 ± 0,06
	Холестаз	86,8 ± 9,29*	32,11 ± 4,45*	42,39 ± 4,41*	12,29 ± 1,48*	153,77 ± 16,16*	1,77 ± 0,03

П р и м е ч а н и е. * – достоверность различий ($p < 0,05$) в сравнении с контролем. То же для табл. 2, 3.

Т а б л и ц а 2. **Толщина слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки и ширина просвета ее капилляров в собственной пластинке слизистой оболочки крысят контрольной и опытной групп, мкм (Me (IQR))**

Показатель, мкм	Контроль	Опыт
<i>15-е сутки</i>		
Толщина слизистой оболочки	360,58 (27,15)	320,72 (12,33)*
Ширина просвета капилляров ворсинок	3,27 (0,45)	6,33 (1,49)*
Ширина просвета капилляров в межкриптном пространстве	2,85 (0,86)	5,2 (1,98)*
<i>45-е сутки</i>		
Толщина слизистой оболочки	743,47 (34,93)	692,86 (72,34)*
Ширина просвета капилляров ворсинок	5,09 (1,29)	10,87 (2,86)*
Ширина просвета капилляров в межкриптном пространстве	4,87 (0,78)	8,94 (1,93)*
<i>90-е сутки</i>		
Толщина слизистой оболочки	747,01 (29,9)	697,19 (26,21)*
Ширина просвета капилляров ворсинок	6,9 (0,63)	10,74 (1,58)*
Ширина просвета капилляров в межкриптном пространстве	5,93 (1,57)	9,66 (2,7)*

У 45-суточных крысят, развивавшихся в условиях холестаза, толщина слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки увеличена почти вдвое, но, несмотря на это, значительно тоньше, чем в контроле (см. табл. 2). Ворсинки меньше, отличаются полиморфизмом, крипты короче и включают меньшее количество эпителиоцитов. Значительное увеличение к этому сроку постнатального развития толщины слизистой крысят контрольной и опытной групп обусловлено переходом с подсосного типа питания на дефинитивный и активацией в органе пищеварительного процесса.

Не последнюю роль в этом сыграли биологически активные вещества тканевых базофилов, имеющих прямое отношение к процессам пролиферации и дифференцировки, а также к регуляции системы микроциркуляции. Доказательством указанного выше служит значительное увеличение в слизистой оболочке двенадцатиперстной кишки, особенно у крысят опытной группы, не только численной плотности тканевых базофилов, но и активно функционирующих их форм (табл. 1, рис. 2).

Таблица 3. Количество эпителиоцитов и их митотический индекс (МИ) в криптах двенадцатиперстной кишки крысят контрольной и опытной групп (Me (IQR))

Группа	Количество эпителиоцитов в крипте	МИ эпителиоцитов крипт двенадцатиперстной кишки, ‰
<i>15-е сутки</i>		
Контроль	24,75 (6,5)	29,0 (11,0)
Опыт	18,5 (3,25)*	16,0 (5,0)*
<i>45-е сутки</i>		
Контроль	96,75 (4,0)	38,0 (10,0)
Опыт	86,0 (9,75)*	35,0 (7,5)
<i>90-е сутки</i>		
Контроль	97,5 (4,25)	32,0 (14)
Опыт	86,75 (11,5)*	29,0 (12,5)

Существенно, в сравнении с контрольной группой, изменялся и типологический профиль тканевых базофилов: в 2,2 раза возросло число дегранулированных форм и в 2 раза – умеренно дегранулированных. Возросло число тканевых базофилов, находящихся в стадии депонирования. Все это указывает на то, что у крысят, развивающихся в условиях эндогенной интоксикации, резко увеличивается не только функциональная активность тканевых базофилов, но и возрастает их насыщенность гранулами, содержащими биологически активные вещества, о чем свидетельствует возросший ГИ. Резкое увеличение функционально активных тканевых базофилов, выделяющих гистамин, приводит к расширению кровеносных капилляров микроциркуляторного русла как в области ворсинок, так и в области межкриптных пространств слизистой оболочки у крысят опытной группы (табл. 2), что сопровождается отеком соединительнотканной основы слизистой и возросшей клеточной инфильтрацией, особенно лимфоцитарной. Последняя часто встречается не только в строме слизистой, но и в расширенных межклеточных пространствах каемчатого эпителия. Среди эпителиоцитов крипт, число которых уменьшено в сравнении с контролем, в значительной мере возрастает пролиферативная активность, о чем свидетельствует возросший в сравнении с предыдущим сроком более чем в 2,6 раза митотический индекс, что приводит к увеличению численности эпителиоцитов.

На 90-е сутки темпы развития стенки двенадцатиперстной кишки у крысят контрольной группы резко замедляются и по морфометрическим показателям ее структурные компоненты существенно не отличаются от таковых у 45-дневных. Это свидетельствует о том, что к 45-м суткам стенка двенадцатиперстной кишки в основном достигает окончательного развития. Несмотря на это, численная плотность в слизистой тканевых базофилов возрастает почти в 3,1 раза. Изменение их типологического профиля, выражающееся в значительном увеличении среди них числа умеренно дегранулированных форм (см. табл. 1), обусловлено, вероятно, адаптацией к увеличенной функциональной нагрузке на орган.

У крысят, развивавшихся в условиях холестаза, несмотря на отставание в развитии структурных компонентов слизистой двенадцатиперстной кишки, сопровождаемое деструктивными изменениями, число в ней тканевых базофилов возросло в сравнении с контролем почти в 2,2 раза. Резко увеличилось среди них число дегранулированных и умеренно дегранулированных форм – в 2 и 2,2 раза соответственно. Количество депонирующих форм тканевых базофилов увеличилось в 1,9 раза, что привело к заметному росту ГИ (в 2,1 раза) (табл. 1). Увеличение численности тканевых базофилов в слизистой оболочке двенадцатиперстной кишки, особенно их активно функционирующих форм, указывает на то, что в условиях холестаза происходит активизация функциональной активности тканевых базофилов.

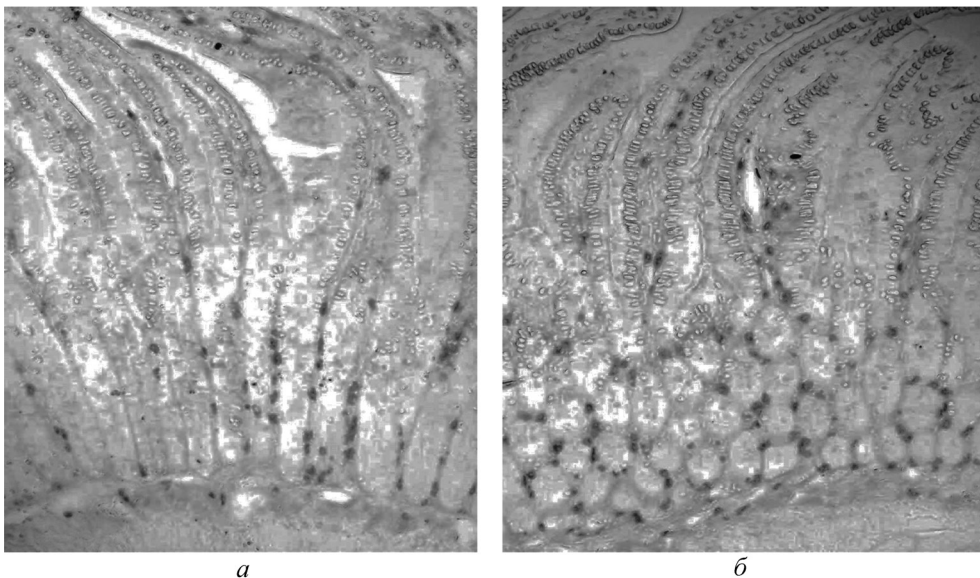


Рис. 2. Общий вид количества тканевых базофилов и их локализация в слизистой двенадцатиперстной кишки у 45-суточного животного контрольной (а) и опытной групп (б). Окраска альциановым синим при рН 1.0. $\times 40$ (об.), $\times 10$ (ок.)

онирующих форм в области расположения крипт, свидетельствует о значительном выбросе ими в основное вещество соединительнотканной основы слизистой биологически активных веществ. Последнее можно расценивать как развитие компенсаторных процессов, направленных не только на активизацию сниженного темпа развития органа, обусловленного эндогенной интоксикацией продуктами холестаза, но и на увеличение его функциональной активности в плане пищеварения. Это сопровождается значительным расширением в слизистой просвета кровеносных капилляров микроциркуляторного русла соединительнотканной основы ворсинок и межкриптных пространств (табл. 2). В соединительнотканной строме, как и на 45-е сутки, все чаще встречались лимфатические фолликулы с выраженным реактивным центром. Это сопровождалось интенсивной лимфатической инфильтрацией слизистой. Митотический индекс среди эпителиоцитов крипт немного снижен в сравнении с контролем, но, несмотря на это, численный состав эпителиоцитов соответствует аналогичному показателю на 45-е сутки.

Заключение. Таким образом, в ходе исследований установлено, что процесс развития двенадцатиперстной кишки наиболее интенсивен в ранние сроки постнатального онтогенеза и к 45-м суткам после рождения животного орган в основном сформирован окончательно. Это обусловлено сменой типа питания и возросшей функциональной активностью органа. У крысят, родившихся в условиях холестаза матери, тенденция развития органа сохраняется, но темпы ее заметно отстают от таковых в контроле. Этот процесс сопровождается значительным увеличением, особенно в слизистой, не только численности тканевых базофилов, но и активно функционирующих их форм – дегранулированных и умеренно дегранулированных клеток. Это обусловлено не только адаптационными, но и компенсаторными механизмами, в которых задействованы русло микроциркуляции, процессы пролиферации и дифференцировки эпителиоцитов, к которым гистамин, серотонин и гепарин имеют непосредственное отношение. Последнее в целом направлено на активацию сниженных процессов пролиферации и дифференцировки эпителиоцитов с целью нормализации не только их количественного, но и качественного состава.

Литература

1. Арташян О. С., Юшков Б. Г., Мухлынина Е. А. // Цитология. 2006. Т. 48, № 8. С. 665–668.
2. Арташян О. С. Система тучных клеток при действии на организм экстремальных факторов: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.13. Екатеринбург, 2006. – 23 с.
3. Затолокина М. А. // Фундаментальные исследования. 2004. № 2. С. 132–133.
4. Кизюкевич Л. С. Реактивные изменения в почках при экспериментальном холестазе. Гродно, 2005. С. 219.
5. Кондашевская М. В., Никольская К. А. // Психофармакол. и биол. наркол. 2002. № 3–4. С. 407–408.

6. Кондрашевская М. В. // Вестн. РАМН. 2010. № 6. С. 49–54.
7. Коцюба А. Е. и др. // Цитология. 2008. Т. 50, № 12. С. 1023–1029.
8. Пирс Э. Гистохимия теоретическая и прикладная. М., 1962. – 962 с.
9. Проценко В. А., Шпак С. И. Тканевые базофилы и базофильные гранулоциты крови. М., 1987. – 128 с.
10. Чернух А. В. и др. // Бюл. эксперим. биол. 1976. № 1. С. 16–19.
11. Чернышев Ю. Н. // Новости мед.-биол. наук. 2012. Т. 5, № 1. С. 49–55.

Ya. R. MATSYUK, Y. N. CHERNYSHEVICH

**AGE-RELATED MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS
OF TISSUE BASOPHILS OF THE MUCOSAL MEMBRANE
OF THE RAT'S DUODENAL DEVELOPING DURING CHOLESTASIS**

Summary

The experiment with 48 (15-, 45- and 90-day) rat pups using the histological, morphometrical, and statistical investigation methods has shown that the rats, which have developed in the conditions of maternal experimental obturational cholestasis, have a delay in the development of the mucosal membrane structures in the rat's duodenal accompanied by increasing the number and functional activity of tissue basophils in comparison to the control. The last fact points to their participation in the development of adaptive and compensatory mechanisms in response to endogenous intoxication with cholestasis products, as well as the increased functional activity of the organ due to the transition from milk to definitive food.