УДК 577.161.1

ВИВЧЕННЯ УЛЬТРАСТРУКТУРИ СЕКРЕТОРНИХ КЛІТИН ЗАЛОЗИСТОГО ШЛУНКА КУРЧАТ В НОРМІ І ПРИ А-АВІТАМІНОЗІ

О. А. Хомутовський, А. А. Душейко, М. М. Великий

Інститут біохімії АН УРСР, Київ

Відомо, що при А-авітамінній нестачі настають біохімічні, морфологічні і функціональні зрушення в органах зору та інших органах і тканинах [4, 21]. Морфологічні дослідження свідчать про те, що при цьому захворюванні найбільше уражуються епітеліальні тканини (настає їх метаплазія). В ембріональному періоді порушується розвиток судинної системи [17], а також виникають аномалії плода [18, 19]; в постнатальному періоді затримується ріст, спостерігаються зміни центральної нервової системи, посилюється кератинізація [12, 20, 21]. Електронномікроскопічні дослідження при А-авітамінозі поодинокі і проведені, переважно, на сітківці ока. Показано, що внутрішня структура зовнішніх сегментів сітківки щурів, яких утримували на А-авітамінозній дієті, порушується: виникає дезорганізація і фрагментація мембран [9], у фоторецепторних клітинах комах з'являються незвичайні мієліноподібні фігури, утворені гладкими мембранами [6]. Останнім часом в літературі з'явились дані про те, що вітамін А істотно впливає на функцію мембран і в інших органах. При надлишку вітаміну А руйнуються мембрани лізосом, мітохондрій, еритроцитів, [8]. Припускають, що вітамін А може включатися в самі мембрани. Більш повну інформацію про вплив вітаміну А на мембрани можна було одержати при вивченні субмікроскопічних структур різних клітин при А-вітамінній нестачі. Нашими раніше проведеними гістологічними дослідженнями було показано, що при А-авітамінозі у курчат ранні і постійні зміни виникають в залозистому шлунку [1]. Тому було доцільно продовжити ці дослідження на субмікроскопічному рівні.

Методика досліджень

Досліди провадились на одноденних курчатах породи леггорн. Одна група (контроль) одержувала повноцінний раціон, друга — такий же раціон, але без вітаміну А [2.] Через один — півтора місяця у курчат, яких утримували на А-авітамінозному раціоні, наставали клінічні ознаки А-авітамінозу. У цей період курчат забивали декапітацією. Тканину залозистого шлунка (залозистий шар) фіксували 2%-ним розчином осмієвої кислоти, забуференої веронал-мединаловим буфером до pH 7,3. Після збезводнення в спиртах і ацетоні об'єкти заключали в ЕПОН-812. Зрізи одержували на ультрамікротомі УМТП-2 і розглядали в електронному мікроскопі УЕМВ—100В.

Результати досліджень

1. Субмікроскопічна організація секреторних клітин трубчастих залоз залозистого шлунка здорових курчат. На думку деяких авторів, трубчасті залози залозистого

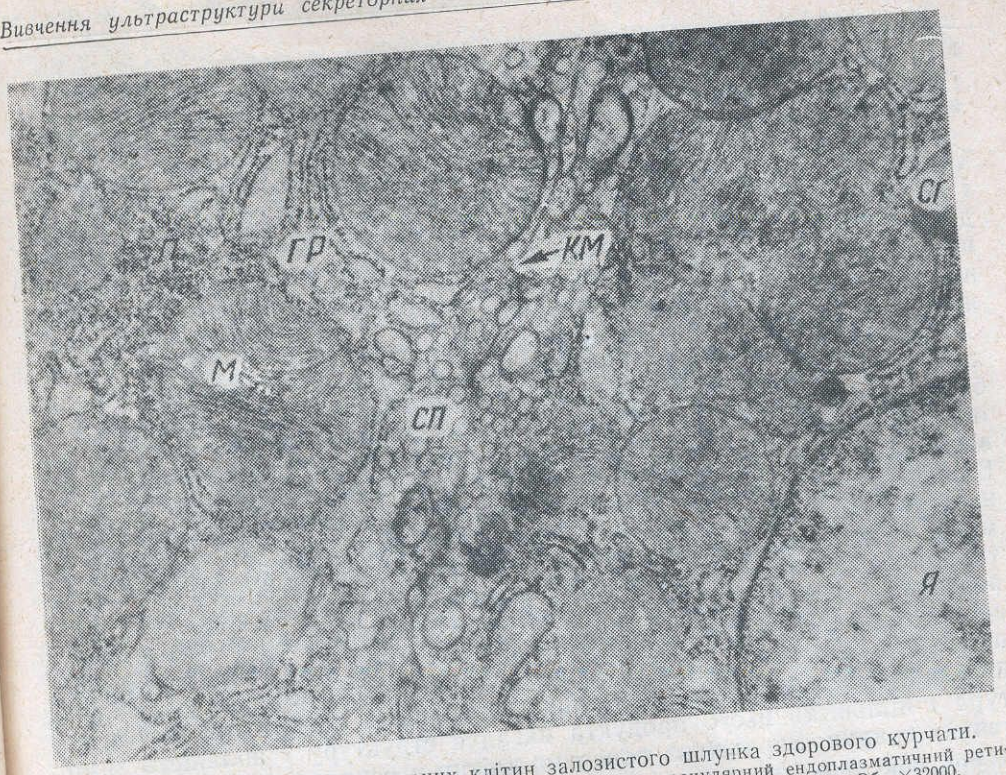

Рис. 1. Ділянки двох секреторних клітин залозистого шлунка здорового курчати.
Я — ядро, *М* — мітохондрії, *СГ* — секреторні гранули, *ГР* — гранулярний ендоплазматичний ретикулум, *П* — полісоми, *СП* — секреторні пухирці, *КМ* — клітинна мембрана. Зб. ×32000.

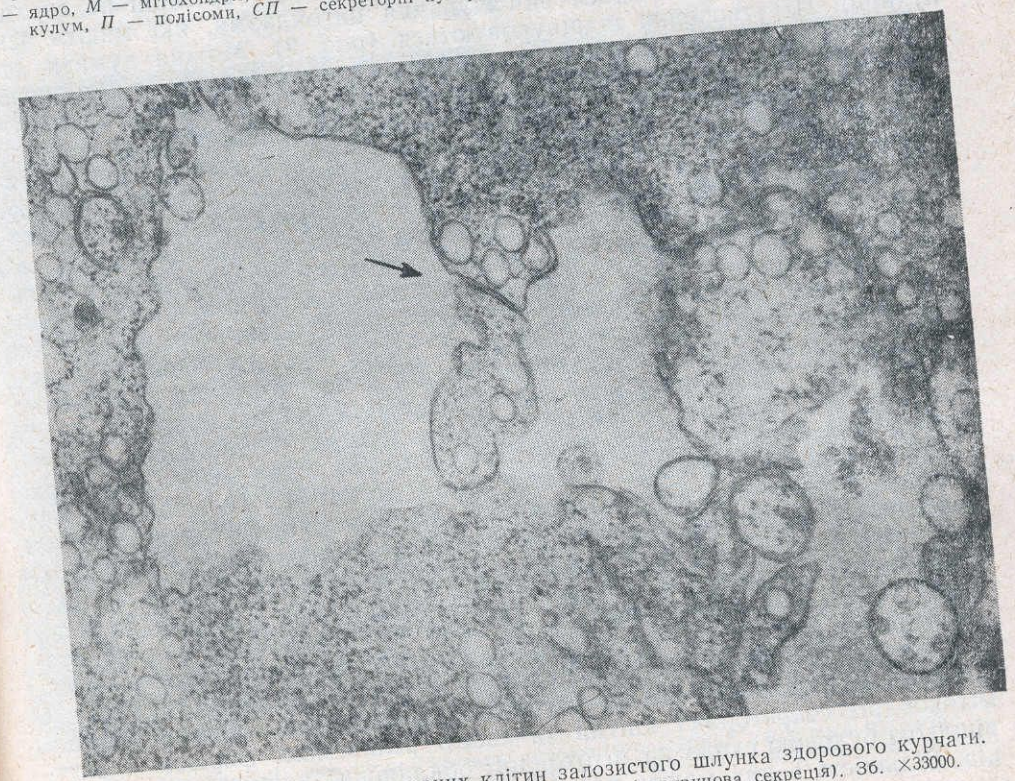

Рис. 2. Апікальні ділянки секреторних клітин залозистого шлунка здорового курчати.
Видно ділянки цитоплазми, які відділяються в протоку (апокринова секреція). Зб. ×33000.

шлунка птахів вислані одним типом секреторних клітин, які виробляють соляну кислоту і пепсиноген [14, 16]. Таким чином, секреторні клітини мають функціональні і морфологічні ознаки головних і обкладових клітин залоз шлунка ссавців.

Секреторні клітини в трубчастих залозах залозистого шлунка курчат розміщені на базальній мембрані, під якою знаходяться капіляри і елементи сполучної тканини. За даними Техвера [5], одержаними з допомогою світлового мікроскопа, форма клітин залежить від їх функціонального стану: у голодних курчат вони циліндричні, у нагодованих — кубічні. Зміни величини клітин відбуваються за рахунок їх верхньої третини, яка не зв'язана з сусідніми клітинами.

Проведені нами електронномікроскопічні дослідження секреторних клітин при малому збільшенні показали, що їх клітинна мембрана в базальному відділі дуже звивиста, вона утворює глибокі складки, які іноді досягають ядра; звивистість клітинної мембрани на бокових поверхнях зумовлена вп'ячуванням виростів сусідніх клітин (рис. 1). Ближче до верхівки звивистість втрачається, і, приблизно на рівні верхньої третини, клітини фіксуються одна з одною за допомогою перемичок, утворених компактними ділянками сусідніх мембран і міжклітинної речовини. Міжклітинний простір в базальних відділах рідко перевищує 150 Å. Ближче до апікальної ділянки він розширюється: спочатку до 500—800 Å, а потім до кількох мікронів, утворюючи «ясні» протоки, в яких розміщені пухирці розміром близько 0,1 *мк* і «темні» протоки, наповнені гомогенним продуктом. Слід відзначити, що структура і щільність цього продукта нагадує структуру і щільність зимогенних гранул. Верхівкова поверхня клітин в основному рівна, і на ній немає ворсинок, як у секреторних клітин ссавців [11]. Іноді на верхівковій поверхні з'являються вип'ячування цитоплазми, які мають ясні пухирці. Ці утворення відшнуровуються (рис. 2). Можна думати, що таким шляхом здійснюється секреція кислоти. Особливо слід підкреслити характер виділення зимогенних гранул. В напрямку, де знаходиться гранула, з боку поверхневої мембрани утворюється пальцевидне вп'ячування. На місті зіткнення мембрани зникають, а через утворений отвір продукт гранули надходить у «темні» протоки (рис. 3). Особливістю будови секреторних клітин у курчат є те, що в їх цитоплазмі і зимогенні гранули і секреторні пухирці знаходяться разом, тоді як у ссавців секреторні пухирці характерні для обкладових клітин, а зимогенні гранули — для головних. Крім того, в клітинах здорових курчат ми не виявили внутріклітинних канальців, через які здійснюється секреція соляної кислоти, як це буває у ссавців.

Зимогенні гранули секреторних клітин залозистого шлунка курчат мають круглу або овальну форму, їх розміри не перевищують 2 *мк*. Вміст гранул дрібнозернистий, з різною щільністю. Кількість гранул, як і у ссавців залежить від функціонального стану [15]. Секреторні пухирці розміром близько 0,1 *мк* також мають круглу або овальну форму і оточені звичайною трьохшаровою мембраною. Вміст пухирців безструктурний, ясний, лише по периферії іноді спостерігаються ущільнені ділянки. В базальних відділах секреторні пухирці в невеликій кількості трапляються лише поблизу ядра, апарата Гольджі та мітохондрій. На апікальних ділянках вони є основним компонентом цитоплазми. Крім пухирців апікальна частина цитоплазми містить вільні рибосоми, поодинокі зимогенні гранули, лізосомоподібні структури і мітохондрії, які тут особливо великі і мають багато крист. Взагалі мітохондрії секреторних клітин за своєю величиною, формою і внутрішньою будовою схожі на мітохондрії обкладових клітин шлунка ссавців. Більшість з них мають розмір до 2 *мк*, округлу або злегка витяг-

Рис. 3. Ділянки секреторних клітин і протока залозистого шлунка здорового курчати.
Видно різні стадії секреції (мерокриновий тип). *1* — гранула, що наближається до протоки, *2* — вп'ячування мембрани в напрямку гранули, *3* — секреція вмісту зимогенної гранули в протоку. Зб. ×48000.

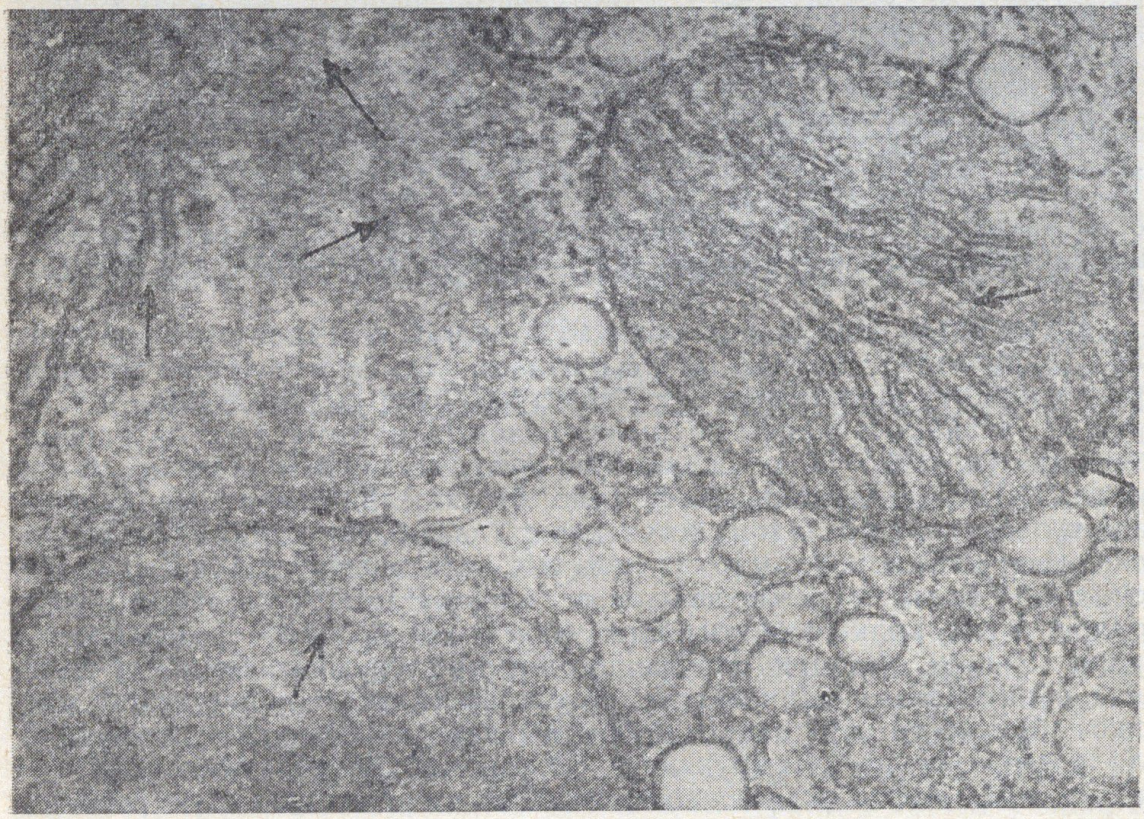

Рис. 4. Мітохондрії секреторної клітини залозистого шлунка здорового курчати.
Стрілками показані рибосомоподібні структури в матриксі мітохондрій та рибосоми гранулярного ретикулуму. Зб. ×75000.

нуту форму і містять велику кількість паралельно розміщених крист. Матрикс мітохондрій в міру щільний, містить рибосоми і поодинокі компактні включення розміром до 400 Å (рис. 4).

В цитоплазмі секреторних клітин курчат є ще один компонент, який зближує їх з обкладовими клітинами ссавців — це система мікротрубочок діаметром 500 Å, утворених гладкими мембранами. Мікротрубочки, як правило, розміщуються на латеральних і апікальних ділянках клітин.

Апарат Гольджі секреторних клітин добре розвинутий, знаходиться поблизу ядер. Він утворений системою парних мембран, між якими розміщуються досить великі (до 2 *мк*) вакуолі. Навколо апарата Гольджі в невеликій кількості знаходяться дрібні пухирці, вакуолі і зимогенні гранули. В районі апарата Гольджі домінують вільні рибосоми, а по його периферії — полісоми. Привертає увагу те, що секреторні клітини курчат, як і головні клітини ссавців, мають також багато α-мембран. В основному вони розміщуються в базальних відділах, поблизу ядер, а іноді утворюють концентричні фігури навколо мітохондрій і, як правило, не мають впорядкованої структури. В деяких поодиноко розміщених клітинах α-мембран особливо багато. Ці клітини помітно відрізняються від інших не тільки числом мембран, а й густотою вільних рибосом в матриксі. Можна думати, що ці структурні особливості зумовлені різницею функції. До гранулярного ендоплазматичного ретикулуму, мабуть, слід віднести також зовнішню мембрану ядер, яка покрита рибосомами, інколи можна бачити її перехід в α-мембрану.

Нуклеоплазма ядер у різних клітинах неоднакова за щільністю, дрібногранулярні компоненти розподілені також нерівномірно. Спостерігається тенденція до накопичення нуклеопротеїдних структур біля внутрішньої мембрани ядра. В нуклеоплазмі інколи видні тонкі (близько 50 Å) фібрили. В ядрах міститься, як правило, одне розміщене в центрі ядерце, звичайної субмікроскопічної організації.

В цитоплазмі секреторних клітин трапляються також мультивезикулярні тіла, мікротільця, ліпідні краплі і лізосоми.

2. Зміни субмікроскопічних структур секреторних клітин на початковій стадії А-авітамінозу. Для зручності ми опишемо стан субмікроскопічних структур секреторних клітин при А-авітамінозі в такій послідовності, яка відповідає ступеню їх ураження.

Мітохондрії. Форми і розміри мітохондрій в секреторних клітинах різко варіювали. Помітно збільшувалась кількість дрібних мітохондрій, причому збереженість їх структури була дещо краща, ніж у крупних. Найбільш виражені зміни виявлені в системі їх внутрішніх мембран (крист). Вони зазнавали розпушення, гомогенізації, фрагментації і осередкового лізису (рис. 5). Інколи гомогенізація крист закінчувалась їх розпадом, і мітохондрії в такому випадку мали вигляд дво- або одноконтурних пухирців, заповнених дрібнозернистою ясною або щільною речовиною. В останньому випадку всередині мітохондрій були видні вакуолі. При фрагментації крист утворювались дрібні пухирці, які при порушенні цілості оточуючих мембран виходили в цитоплазму. Привертало увагу, що електронна щільність матрикса більшості мітохондрій була меншою в порівнянні з нормою, але розміри їх не збільшувались. Ознак набрякання мітохондрій не виявлено. В тих випадках, коли мембрани крист були мало змінені, порушувалась закономірність їх розміщення, спостерігалось осередкове розширення міжмембранного простору і зменшувалась щільність матрикса. Іноді в більшій мірі порушувалась зовнішня мембрана: на-

ставало її розпушення. В інших випадках обидві мембрани, зовнішня і внутрішня, зливались і мали вигляд одного пухкого або компактного контура. До цього слід додати, що в дистрофічних мітохондріях ми не виявили поодиноких компактних включень, які містяться в мітохондріях здорових тварин.

Ядра. Ядра часто мали неправильну форму, їх розміри зменшувались. На зовнішній мембрані ядер зменшувалось число рибосом. Електронна щільність зовнішньої мембрани змінювалась, але частіше вона була розпушена. Цілість внутрішньої мембрани порушувалась рідко, проте її ясний внутрішній шар подекуди був розширений. Інколи ущільнювалась внутрішня мембрана. Щільність нуклеоплазми наростала за рахунок збільшення числа більш компактних нуклеопротеїд-

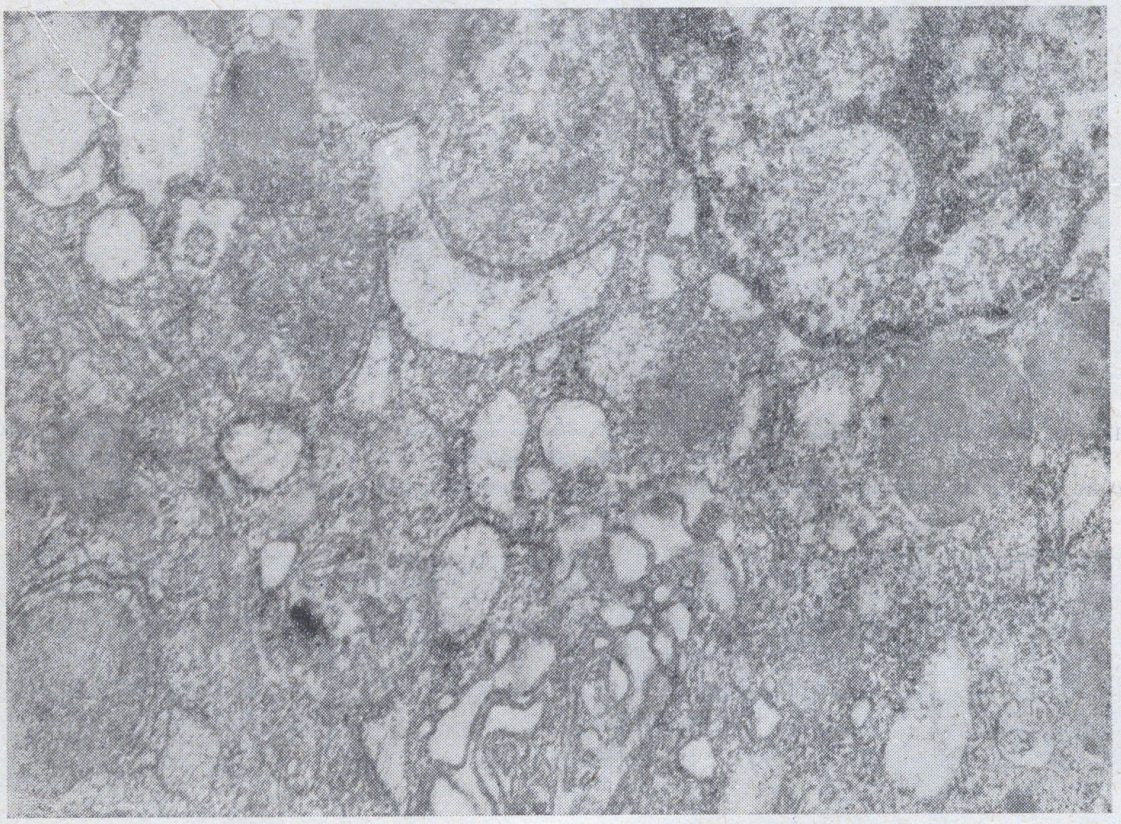

Рис. 5. Ділянка секреторної клітини залозистого шлунка А-авітамінозного курчати. Видно дегенеративні зміни в нуклеонемі ядерця, число α-мембран зменшено, основна маса рибосом перебуває у вільному стані. Апарат Гольджі гіпертрофований, цистерни ендоплазматичного ретикулуму розширені. В мітохондріях спостерігається фрагментація і гомогенізація крист. Зб. ×20000.

них структур, які часто зосереджувались біля внутрішніх мембран або ядерець. В нуклеоплазмі деяких ядер збільшувалось чимало фібрилярних структур. Будова ядерець в багатьох ядрах помітно змінювалась: на місці нуклеонеми з'явились вакуолі, кільцеподібні фібрилярні структури без гранул РНК. В деяких випадках ядерця ставали майже гомогенними, і зменшувалась їх електронна щільність. Іноді ж ядерця були деформовані вакуолями, які виникали в їх центрі або по периферії. Поблизу ядер з'являлись крупні ліпідні включення, які іноді деформували ядро. До ядер також наближались мітохондрії.

Ендоплазматичний ретикулум. Зміни в гранулярному ретикулумі характеризувались зменшенням числа α-мембран, а також розширенням міжмембранного простору з утворенням цистерн і пухирців. Більшість α-мембран розміщувалась навколо мітохондрій і поблизу ядер. Кількість гладких мембран в багатьох клітинах збільшувалась, але

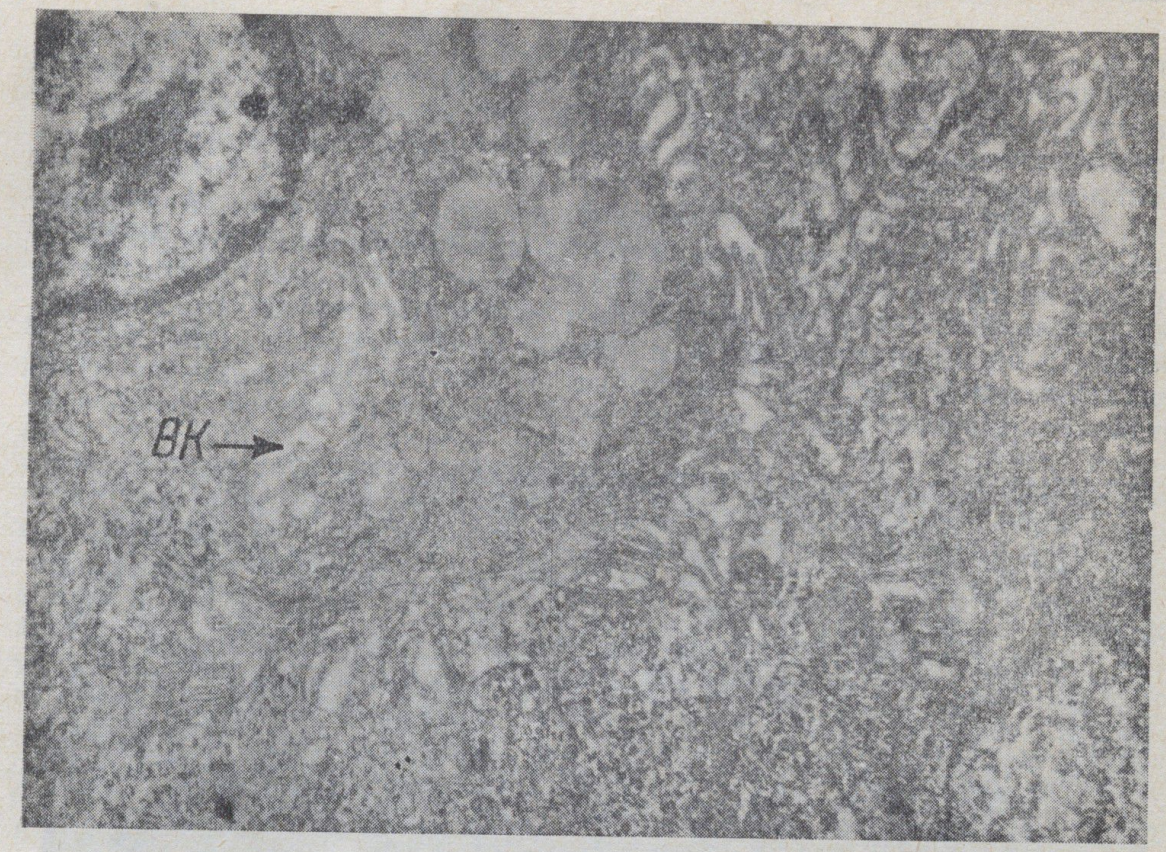

Рис. 6. Епітеліальні клітини трубчастих залоз залозистого шлунка А-авітамінозного курчати на стадії диференціації.
Видно утворення внутріклітинних канальців (*ВК*), що не характерно для секреторних клітин птахів. Зб. ×14000.

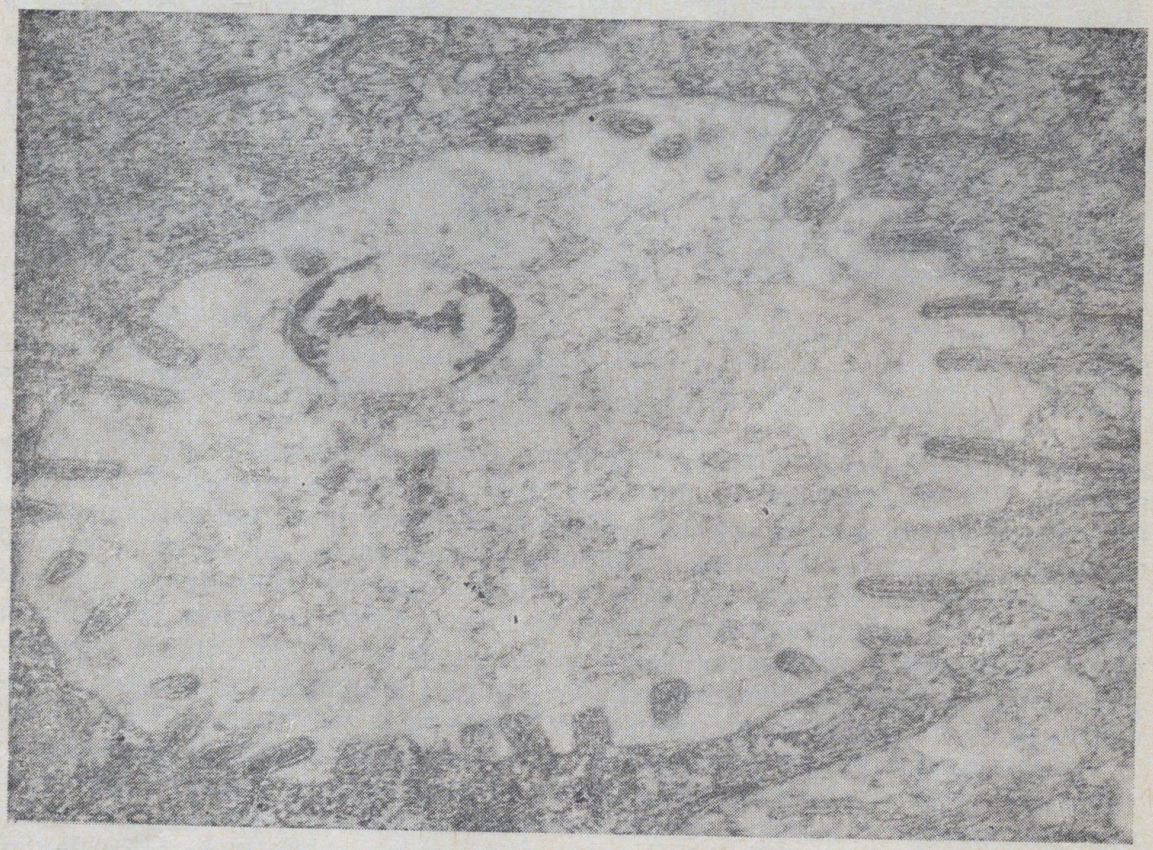

Рис. 7. Атипова вивідна протока, що утворилася між секреторними клітинами залозистого шлунка курчати при А-авітамінозі.
Зб. ×30000.

розміщувались вони хаотично. Гладкі мембрани утворювали крупні вакуолі, дрібні (менше 0,5 *мк*) пухирці. Частіше, ніж у нормі, траплялись мікротрубочки. В деяких молодих клітинах утворення гладких мембран, мікротрубочок і дрібних пухирців йшло настільки інтенсивно, що ними заповнювалась уся цитоплазма.

Рибосоми і полісоми. В більшості клітин рибосоми розміщувались в цитоплазмі вільно. Число рибосом, зв'язаних з мембранами, зменшувалось. Кількість вільних рибосом у цитоплазмі молодих клітин істотно не відрізнялась від норми. Значно рідше, ніж у нормі, траплялись полісоми.

Вакуолі. Як уже було відзначено, кількість великих і малих вакуолей в клітинах збільшувалась. Крім того, збільшення вмісту води в клітинах, мабуть, відбувалось також за рахунок дрібних пухирців, обмежених ущільненими ділянками цитоплазми. В деяких клітинах вся цитоплазма була заповнена такими пухирцями.

Апарат Гольджі. В багатьох клітинах апарат Гольджі був гіпертрофований і розміщувався на кількох ділянках однієї і тієї ж клітини. Парні гладкі мембрани були звивисті і обмежували ясні, неправильної форми, великі ділянки. Навколо апарата Гольджі розміщувались крупні вакуолі, в невеликій кількості дрібні (близько 0,1 *мк*) пухирці, секреторні гранули і мітохондрії.

Зимогенні гранули і секреторні пухирці. Складається враження, що загальна кількість секреторних гранул і пухирців істотно не змінюється. Можливо навіть, що число компактних зимогенних гранул трохи збільшується. Інтенсивність утворення секреторних пухирців, мабуть, теж істотно не порушується, оскільки в апікальних ділянках клітин їх було досить багато, і форма їх не змінювалась.

Цитоплазматичні включення. В багатьох секреторних клітинах помітно наростало число великих і малих ліпідних включень, які розміщувались в центральних ділянках клітин. Іноді по периферії клітини спостерігались незамкнені мембранами безформні маси низької електронної щільності.

Зміни диференціації епітеліальних клітин трубчастих залоз залозистого шлунка курчат. Ці дані доцільно описати окремо, оскільки відхилення в диференціації секреторних клітин при А-авітамінозі були дуже істотні. Виявлені такі клітини, які за субмікроскопічною організацією можна було б віднести до секреторних, водночас у них з'являлись внутріклітинні канальці, які не характерні для секреторних клітин курчат (рис. 6). Ці канальці були покриті вип'ячуванням цитоплазми, які нагадували ворсинки. Інколи такі канальці проникали в глибину клітини аж до ядра. Другою ознакою відхилення від норми було утворення ворсинок на бокових поверхнях клітин, що також характерно лише для секреторних клітин ссавців. Ворсинки мали типову будову: в центрі знаходилась трубочка, яка в міру проникнення в цитоплазму поступово звужувалась. В деяких випадках спостерігались протоки між клітинами, які теж були вислані ворсинками (рис. 7).

Обговорення результатів досліджень

Наші дані про субмікроскопічну організацію секреторного епітелію залозистого шлунка здорових курчат відповідають результатам аналогічних досліджень, виконаних Зеландером [16]. Вони підтверджують думку, що в залозистому шлунку птахів є лише один тип секреторних клітин, які виконують функцію і головних і обкладових клітин шлунка ссавців. Одержані дані дозволяють глибше зрозуміти характер секреторних процесів. Очевидно, секреторні клітини залозистого

шлунка курчат можуть здійснювати секрецію за мерокриновим типом (виділення пепсиногену з гранул у міжклітинний простір) і за апокриновим типом (відторгнення ділянки цитоплазми з пухирцями).

Проведені дослідження показують, що при А-вітамінній нестачі виникають субмікроскопічні зміни в усіх секреторних клітинах трубчастих залоз залозистого шлунка курчат. Проте виразність цих змін в різних клітинах неоднакова, в одних виникають дистрофічні зміни субмікроскопічних структур (в основному, мітохондрій, ядер та ендоплазматичного ретикулуму), а в інших — різко дегенеративні некротичні процеси, які закінчуються загибеллю клітини. Зміни, які в них відбуваються, мабуть, зумовлені не тільки дегенеративними процесами, а й порушенням компенсаторних механізмів, внаслідок чого з'являються клітини незвичайні за своєю субмікроскопічною організацією. Виявлені внутріклітинні канальці і мікроворсинки на бокових поверхнях деяких клітин свідчать про порушення диференціації залозистого епітелію. Порушення диференціації клітин проявляється також і в гіперпродукції гладких мембран.

Останнім часом в літературі з'явилось багато даних про те, що надлишок вітаміну А, як *in vivo,* так і *in vitro,* викликає лізис еритроцитів, фібробластів, лізосом, мітохондрій та інших структурних компонентів [8]. Виявлено підвищення незв'язаної з структурою активності деяких лізосомальних ферментів і при А-авітамінозі, яке також пояснюють порушенням мембранних оболонок. Виходячи з цих спостережень, була висунута гіпотеза, що вітамін А є незамінним компонентом біологічних мембран. Проте прямих експериментальних доказів, які підтверджували б цю гіпотезу, ще немає. Всі міркування про мембранну функцію вітаміну А грунтуються на його поверхневоактивних властивостях і на тому, що надлишок його викликає розпад мембран. Наші дані показують, що при А-авітамінозі дійсно настають структурні зміни біологічних мембран ядер, мітохондрій, гладкого ретикулуму: зменшується щільність матрикса мітохондрій, вакуолізується цитоплазма, підвищується щільність компонентів нуклеоплазми. В зв'язку з цим слід нагадати, що при А-вітамінній нестачі постійно збільшується вміст води в залозистому шлунку [13]. Оводнення клітин безсумнівно пов'язано з порушенням проникності клітинної оболонки та електролітного балансу. Можливо, що порушення проникності клітинних мембран і є першопричиною всіх змін, які розвиваються при А-авітамінозі.

Про вплив вітаміну А на диференціацію клітин свідчать відомості [10, 21], в яких було показано, що при надлишку вітаміну А епідермальний ороговілий епітелій диференціюється у циліндричний епітелій з бокаловидними клітинами, які виділяють слиз [18]. Наші дані показують, що і при А-авітамінозі порушується диференціація ростучих клітин високоспеціалізованого епітелію залозистого шлунка курчат.

Висновки

1. В трубчастих залозах залозистого шлунка курчат є лише один тип секреторних клітин, яким притаманні морфологічні ознаки головних і обкладових клітин ссавців.

2. Особливості субмікроскопічної організації секреторних клітин (наявність зимогенних гранул і секреторних пухирців) дозволяють вважати, що одна і та ж клітина може виробляти і пепсин, і соляну кислоту, причому секреція соляної кислоти здійснюється за апокриновим типом, а пепсину — за мерокриновим.

3. Встановлено, що при А-авітамінній нестачі в секреторних клітинах залозистого шлунка курчат розвиваються дистрофічні, дегене-

ративні і некротичні процеси. Вираженість їх у різних клітинах неоднакова. Найбільш ураженими були мітохондрії, ядра, ендоплазматичний ретикулум.

4. Зміни субмікроскопічної організації секреторних клітин свідчать про те, що при А-авітамінозі порушується процес їх диференціації: з'являються внутріклітинні канальці, мікроворсинки — структури характерні для обкладових клітин ссавців.

Література

1. Душейко А. А., Великий М. М.— Укр. біохім. журн., 1970, 42, 4, 530.
2. Душейко А. А., Великий М. М., Артеменко М. А.— Укр. біохім. журн., 1969, 41, 1, 31.
3. Леутская З. К., Любович Е. Н., Леутский К. М.— ДАН СССР, 1970, 195, 4, 953.
4. Натансон А. О.— В кн.: Витамин А и А-витаминозная недостаточность, М., 1961.
5. Техвер Ю. Т.— В кн.: Гистология домашних птиц, Тарту, 1965.
6. Carlson S., Gemine G., Robbins W.— Exsperimentia, 1969, 25, 175.
7. Cavaleris C., Matukas V., Krikos G.— Arch. Oral. Biol., 1969, 14, 11, 1315.
8. Dingle J., Lucy J.— Biol. Rev., 1965, 40, 422.
9. Dowling J., Wald G.— Vitamins a. Hormones, 1960, 18, 528.
10. Fell H., Mellanby E.— J. Physiol., 1953, 119, 470.
11. Helander H.— J. Ultrastructure Research, Suppl., 1962, 4.
12. Irving J., Richard M.— Biochem. J., 1940, 34, 2, 195.
13. Lawrence D., Bern H., Steadman M.— Annals of Otology, Rhinology and Laryngology, 1960, 69, 3, 645.
14. Luppa H.— Aves. Acta Histochem., 1962, 13, 233.
15. Sedar A., Fridman M.— J. Biochem. Biophys. Cytol., 1961, 11, 349.
16. Selander U.— Acta Anatomica, 1963, 55, 299.
17. Thompson J., Howell J., Pitt G.— Nature, 1965, 205, 1006.
18. Warkany J., Roth C.— J. Nutr., 1948, 35, 1.
19. Wilson J., Warkany J.— Am. J. Anat., 1949, 85, 113.
20. Wolbach S., Bessey O.— Physiol. Rev., 1942, 22, 223.
21. Wolbach S., Bessey O.— Arch. Pathol., 1941, 32, 689.

Надійшла до редакції
26.II 1971 р.

STUDY OF SECRETORY CELLS ULTRASTRUCTURE OF CHICKEN GLANDULAR STOMACH AT NORM AND A-AVITAMINOSIS

O. A. Khomutovsky, A. A. Dusheiko, N. N. Veliky

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences, Ukrainian SSR, Kiev

Summary

Electron-microscopic investigation is carried out of pipe glands of glandular stomach in chicken at norm and at A-avitaminosis. It is established that in pipe glands of chicken glandular stomach there is only one type of secretory cells, which possess the morphological characters of main and parietal cells of mammals. However as distinct from parietal cells in the secretory cells of chicken glandular stomach the intracellular canals are absent and there are no microfibres on their surfaces. The data obtained permit considering that secretion of pepsinogene from zymogenic grains is realized by merocrinic type, and secretion of muriatic acid from secretory bubbles — by apocrinic type. It is shown that at A-vitaminous insufficiency in secretory cells of chicken glandular stomach the dystrophic and necrotic processes develop, their expressiveness being different in different cells. Mitochondria, nuclei, endoplasmatic reticulum proved to be affected most of all. Submicroscopic changes in secretory cells which can be conditioned by disturbance in structure and function of biological membranes are found out. Change in submicroscopic organization of secretory cells testifies also to the fact that their differentiation is disturbed at A-avitaminosis: intracellular canals, microfibres — the structures typical of mammal parietal cells appear.