

АНАТОМІЯ І ФІЗІОЛОГІЯ ЛЮДИНИ І ТВАРИН

УДК 576.469.16/611-018

І.В. Шуг¹, І.І. Шуг²

¹Тернопільський державний педагогічний університет ім. Володимира Гнатюка
46027 Тернопіль, вул. М. Кривоноса, 2

²Medical Research Group Inc., Sylmar, California, U S A

ВЗАЄМОДІЯ ЛАКТОЦИТІВ І МІКРОГЕМОСУДИН ПРОТЯГОМ СЕКРЕТОРНОГО ЦИКЛУ І ПОСТЛАКТАЦІЙНОЇ РЕСТРУКТУРИЗАЦІЇ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

*лактоцити, гемокапіляри, регресія молочної залози, апоптоз лактоцитів, апоптоз ендотеліоцитів
колагс тобуло-альвеолярних компартментів*

Особливістю молочної залози є її циклічне функціонування: згасання функції після відняття мляків (запуску) і відновлення секреції при наступній лактації, що пов'язано з перебудовою органу, його інволюцією і проліферацією. Регулюється секреція залози комплексом взаємодій лактогенних гормонів і рівнем функціональної активності [9].

У минулому десятиріччі при дослідженні лактаційного процесу дослідники особливу увагу приділяли вивченню ролі у стимуляції лактації гормонів [1, 11, 14], ферментів [8, 10] та інших біологічно активних речовин [5, 6]. Проаналізована участь ядерних факторів в інволюції залози [3, 12] та при апоптозі лактоцитів [4, 7]. Однак надзвичайно мало уваги приділено дослідженню взаємозв'язку між лактоцитами і гемокапілярами протягом лактаційного циклу [2, 13].

Нацим завданням було відслідкувати зміни в молочних криоцитах і суміжних з ними похідних мезенхіми, головним чином гемокапілярах, упродовж лактаційного циклу з метою виявлення їх взаємодії.

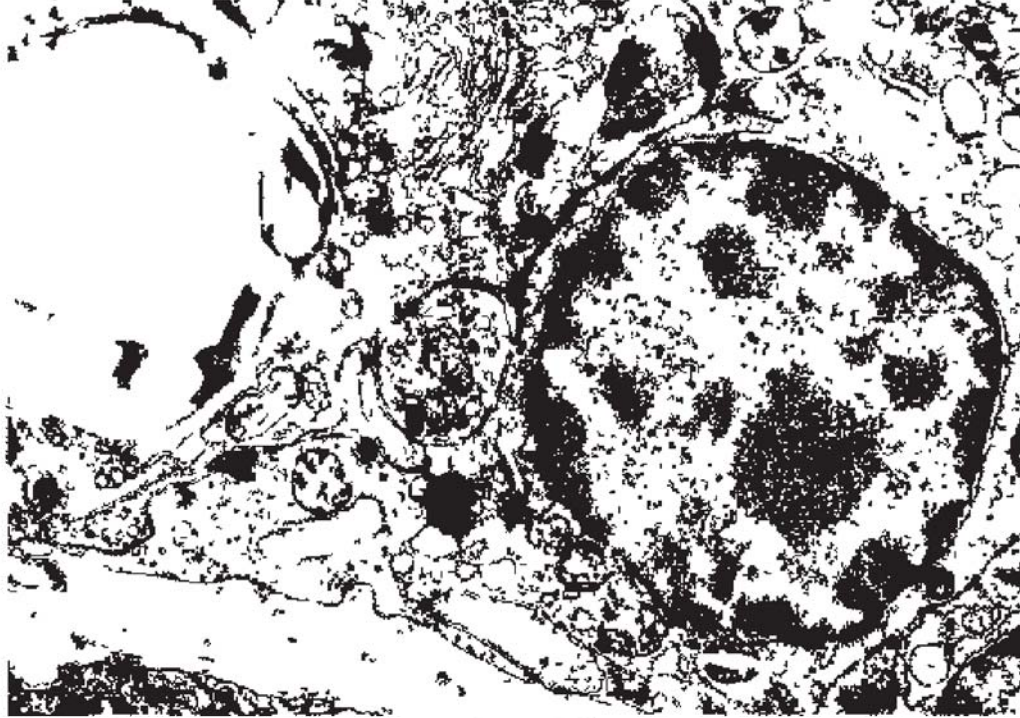
Матеріали і методи досліджень

Дослідження молочної залози проведені на самках шурів на різних стадіях лактації: 1 — перед родами; 2- під час інтенсивного галактопоезу; 3 — при затуханні лактації; 4 — під кінець лактаційного періоду після відлучення мляків. У кожну групу входило по 5 тварин (мала морфологічна вибірка). Експериментальним матеріалом обрано тканини молочної залози, які брали шляхом біопсії під ефірним наркозом. Для електронномікроскопічних досліджень шматочки органу фіксували за методикою Мілоніга та контрастували за Рейнольдсом. Гістохімічними методиками виявляли нуклеинові кислоти (за методикою Браше), білки (за Бонхеном у нашій модифікації), ліпіди (за Хейлом) [2].

Результати досліджень та їх обговорення

В останні дні вагітності в молочній залозі з'являється багато відносно невеликих клітин переважно кубічної форми, що широкою основою прилягають до базальної мембрани (мал. 1). Така клітина на домінальній поверхні містить окремі мікроборсинки, до базального полюса звичайно прилягає невеликий відросток міоепітеліоцита. Лактоцит має округле ядро, в якому

переважає дифузний хроматин, скупчення конденсованого хроматину прилягають до каріолеми, за винятком порових комплексів, вільних від конденсованого хроматину. Перинуклеарний простір вузький, рівномірної ширини, з'єднаний великою кількістю анастомозів з ендоплазматичною сіткою. Клітинний органон помірно розвинений. У цитоплазмі багато вільних полісом, цистерни ЕС дещо розширені, мітохондрії майже круглі з короткими гребінчастими кристами що радіально йдуть від внутрішньої мембрани до середини органели. Стан ядра і розвиток органел такого лактоцита свідчить про те, що він готується до синтезу білка. Йх умовно можна назвати *підготовчими* або *могочими* лактоцитами.



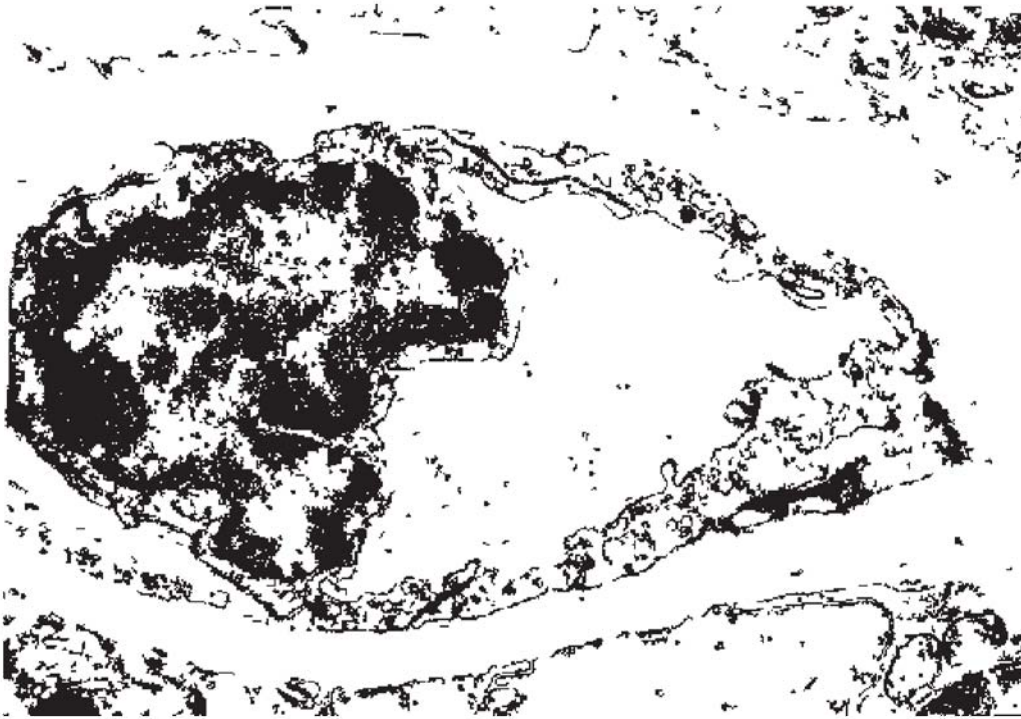
Мал. 1.
Лактоцити:
початковий
(праворуч) і
білоксинтезійний
(ліворуч) з великою
білковою гранулою.
36. 12000x

Як в останні дні вагітності, так і безпосередньо після родів, виявляється відносно велика кількість базальних яєних клітин, частина з яких перебувають на стадії диференціації як у бік лактоцитів, так і м'єоепітеліальних клітин.

Напередодні родів у альвеолах залози з'являється більше клітин з ознаками активного секреторного процесу і добре розвиненим білоксинтезним комплексом. Такі *початкові* молочні криноцити характеризуються наближеною до кубічної формою, ядро в основному округле. Перинуклеарний простір дещо розширений. У цитоплазмі знаходиться добре розвинений клітинний органон, особливо багата гранулярна ЕС, мітохондрії більш овальної форми. Секреторні включення — білкові гранули — в основному дрібні, містять осміофільні включення різної електронної щільності. Білкові гранули частково оточені мембраною.

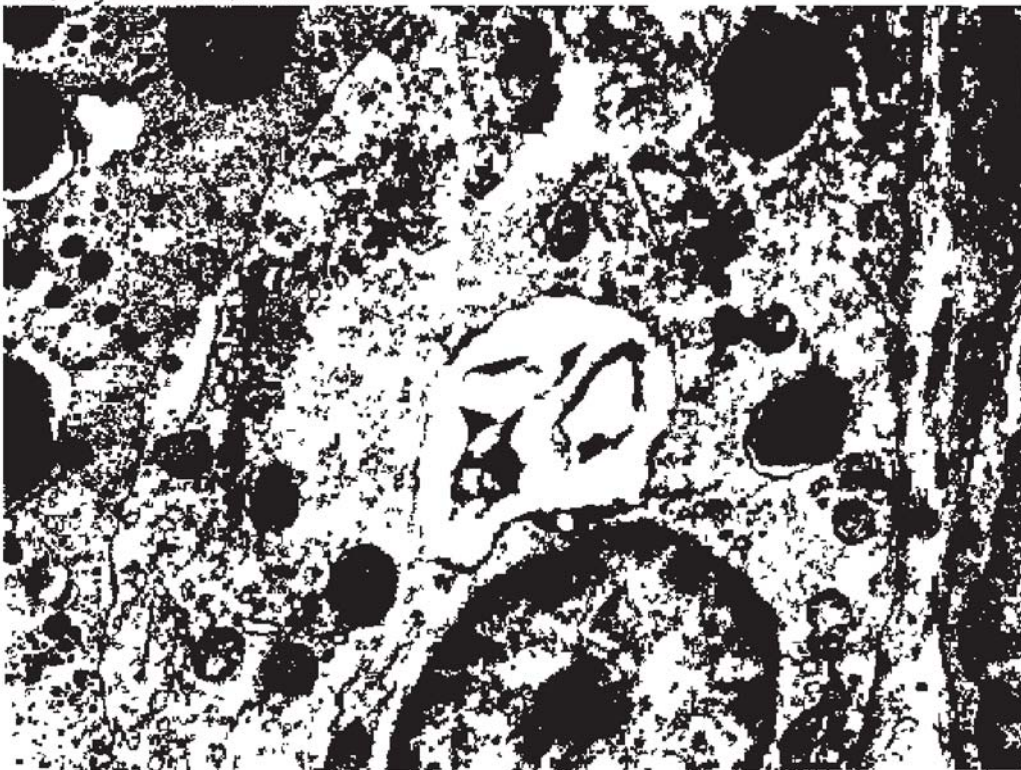
Безпосередньо перед родами і в перші дні лактації кровоносні капіляри густою сіткою обплігають альвеоли. Стінку капіляра формують ендотеліоцити, які щільно контактують між собою. Вони мають безперервну ендотеліальну стінку без пор і фенестр з суцільною базальною мембраною. На поперечному перерізі капіляра найчастіше видно три ендотеліоцити, з яких один з перикаріоном, а два інших представлені периферичними стоїченими ділянками. Це так звані ламеллярні зони ендотеліальних клітин. На люмінаційній поверхні ендотеліоцит часто містить декілька микроворсинок рівномірної товщини і різної висоти.

Ядра ендотеліоцитів мають наближену до округлої або трикутної форми з незначними інвагінаціями, містять переважно дифузний хроматин, особливо в центральній частині ядра, невелике яєрце. Овальної форми мітохондрії з рідко розмішеними кристами знаходяться поблизу ядра, ендоплазматична сітка у вигляді коротких цистерн з прилеглими до них полісомами. Мікропіноцитозні міхурці переважно невеликі круглої форми, розміщені в периферійних ділянках цитоплазми ендотеліоцитів. Деякі міхурці вузькою шийкою з'єднані з плазмолемою. Поодинокі більші везикули мають овальну форму, розміщені вільно в цитоплазмі, хоч можуть з'єднуватися з дрібними міхурцями. Контакти між ендотеліальними клітинами звичайно мають форму товстих пластинок з вузькою щілиною.



Мал. 2.
Капіляр, оточений
метаболічним
прошарком.
Ліворуч ядро
ендотеліоцита.
Зб. 8000х

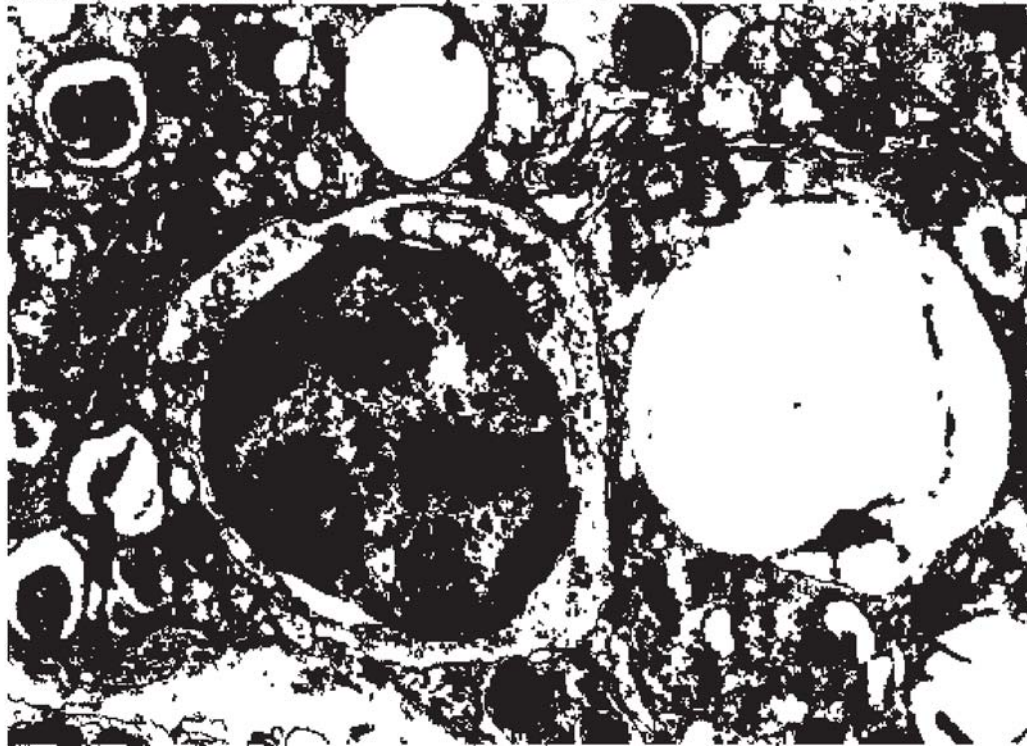
На поверхні зрізу кожного ендотеліоцита знаходиться від одного до трьох відростків перицита, базальна мембрана якого зливається з базальною мембраною ендотелію. Можливо це розшарована базальна мембрана ендотелію, яка охоплює перицит, особливо його відростки, оскільки на зовнішній поверхні перинуклеарної ділянки перицита базальна мембрана може стонщуватися або зникати.



Мал. 3.
Колостральний
лактоцит.
У центрі характерна
гранула з
нагромадженням
осміофільних
включень.
Зб. 10000х

У перші дні лактогенезу, в так званій молозивній період, з'являються лактоцити, які відрізняються від описаних клітин. Поряд з добре розвиненими органелами гранулярної ЕС і комплексом Гольджі та білковими гранулами містяться особливі білкові включення з залишками мембран, які мають розмиті контури. Як правило вони містять великі осміофільні включення в середині гранул. Дані показники свідчать про позалактоцитне походження цих включень. Можливо, що ці секреторні включення потрапили в ацинозні клітини шляхом ендцитозу з плазми крові через капіляри або з плазмодитів і повинні бути у складі секрету — молозива. Такі лактоцити названі нами умовно *колостральними* через те, що вони з'являються

в молозивний період. мають характерні білкові гранули із залишками великої кількості осміофільних мембран і з завершенням молозивного періоду зникають



Мал. 4.
Лімфоцит у стінці альвеоли між двома лактоцитами. Праворуч у лактоциті велика білкова гранула. 36. 7000x

У товщі стінки альвеоли молочної залози в період молозивної секреції виявляються лімфоцити з добре розвиненими мітохондріями, цистернами і канальцями ендоплазматичної сітки, а також з полісомами в цитоплазмі. Поряд з колостральними і білоксинтезними лактоцитами зустрічаються також плазмоцити



Мал. 5.
Ліпідпродукційний лактоцит. Ліворуч ядро, праворуч і зверху великі ліпідні глобули з артефактом смугастості. 36. 11000x

Капіляри, що прилягають до альвеол в молозивний період, децю відрізняються від описаних у період перед родами. Вони мають ширші просвіти, більш тонкі периферичні стощені ділянки, меншу кількість низьких мікроворсинок. Біля міоендотеліальних контактів часто знаходяться лімфоцити

Характерною особливістю капілярів молочної залози під час лактації є широкий просвітлений перикаплярний простір з малою кількістю мікрофібрилярних утворів, що проходять у різних напрямках. Звичайно цей простір ширший у місцях розміщення лактоцитів з добре розвиненим синтезним апаратом і вузький там, де за простором знаходяться

міоепітеліальні клітини, або лактоцити, наповнені секреторними вклученнями, тобто такі, що закінчили в даний момент секреторний цикл. Зовнішній контур перикапілярного простору відокремлений від латоцитів та міоепітеліальних клітин базальною мембраною з дещо тоншим шаром *Lamina densa*, яку супроводить чітко виражена *Lamina rara interna*



Мал. 6.
Екскривний
лактоцит. Навколо
ядра цитоплазма
наповнена ліпідними
глобулами різної
величини.
Зб. 7000х

У максимумі лактаційного процесу з'являються криноцити, які знаходяться на різних стадіях секреторного процесу. Більшість лактоцитів мають кубічну форму з ядром округлої форми, в якому міститься дифузний хроматин. У цитоплазмі знаходяться добре розвинені органели, особливо багатий білоксинтезний комплекс — гранулярна ендоплазматична сітка з дещо розширеними цистернами і великою кількістю асоційованих рибосом. Секреторні вклучення і білкові гранули невеликі, рівномірно розміщені в цитоплазмі. Вони бувають частково оточені мембраною і містять більші або менші осміофільні вклучення. У таких лактоцитах можуть знаходитися невеликі ліпідні глобули. Означені альвеолярні клітини синтезують переважно білкові гранули — це *білоксинтезні* лактоцити.

Криноцити з переважним ліпідутворюваними функціями (*ліпідопродукційні* лактоцити) характерні тим, що мають добре розвинену гладку ендоплазматичну сітку помежовану з овальними мітохондріями і ліпідні глобули різного розміру і ступеня зрілості, які займають переважно апікальну частину криноцита.

В *екструзивних* лактоцитах ліпідні глобули частково або з усіх сторін оточені мембранами. Для великих глобул характерний *артефакт смугастості*, який виникає при різанні твердих, осміофільних вклучень. Чим більші глобули, тим вони сильніше осміофільні. Особливістю цих лактоцитів є те, що поряд з ліпідними вклученнями завжди виявляється слабо розвинена гладка ЕС і дрібні мітохондрії. Часто в таких лактоцитах виявляються лізосоми.

Одночасно з цим виявляється багато клітин ацинарного компартменту в стані голокринової секреції, для яких характерне руйнування плазмолеми. В ядрі цих клітин переважає конденсований хроматин. Цитоплазма ацинарних клітин на перших порах перетовнена жировими вклученнями. Голокринові клітини альвеол можуть мати ознаки деструкції різної глибини, аж до перетворення їх у секреторний детрит. Слід відзначити наявність різниці між ліпідними глобулами, які з'явилися в просвіті альвеол внаслідок мерокринової, апокринової та голокринової секреції. Ця різниця полягає в оформленні глобул. На нашу думку при мерокриновій секреції ліпідні глобули не оточені мембранами. При апокриновій вони як правило мають мембрани лише з одного боку, тоді як глобули, що виникли внаслідок голокринового типу секреції, оточені мембраною майже з усіх боків.



Мал. 7.
Секреторний дендрит
у просвіті альвеоли.
Внизу ядро в стані
деструкції.
Зб. 9000х

Капіляри в період інтенсивної секреції відзначаються головним чином тим, що в периферійних ділянках цих капілярів містяться багато мікроніциторозних везикул.

На другий день після відлучення малят від матері відзначається перша фаза інволюції молочної залози. Вона характеризується появою поодиноких лактоцитів з явищами *апоптозу*. Такі клітини мають сплюснену форму. Ядро слабо деформоване з відсутністю перинуклеарного простору, мармурізацією хроматину і вакуолізацією центральної частини ядра. Ендоніазматична сітка значно розширена, окремі цистерни можуть займати від 1/3 до 1/2 площі цитоплазми. При подальших деструктивних змінах у цитоплазмі залишки мембран цих органел формують своєрідний кластер — скупчення фрагментів мембран.

Поряд з цим гемокапіляри змінюються незначно. Вони, як і в лактаційний період, густою сіткою облітають альвеоли. Цитоплазма перикаріона ендотеліоцитів як правило вузька, бідна піноцитозними міхурцями. На люмінальній поверхні ендотеліоцитів містяться невеликі мікроворсинки. Місцями дещо змінюється перикапілярний метаболічний прошарок. Він стає світлішим, тканина розволоknена. Базальна мембрана капілярів локально має розпливчасті контури.

На третій-четвертий день після відлучення малят відбувається часткове відокремлення груп лактоцитів від базальної мембрани альвеоли і деструкція цих лактоцитів продовжується в просвіті ацинуса. Ендотеліоцити гемокапілярів реагують по-різному в залежності від сусідства їх з альвеолами. Відбувається диференціація ендотеліальних клітин на ясні і темні. При цьому темні ендотеліальні клітини розташовуються поряд з лактоцитами зі збереженою структурою. Вони мають стоншену периферійну ділянку цитоплазми з видовженими мікроворсинками. Цитоплазма таких ендотеліоцитів інтенсивно осміофільна. В ній добре видно органели. Окремі мітохондрії зморщені і мають деформовані кристи. Піноцитозні міхурці поодинокі і дрібні. Метаболічна зона між темним ендотеліоцитом і активними лактоцитами широка і містить багато міхурців різних розмірів та форми, а також осміофільні скупчення невизначеної форми.

Світлі ендотеліальні клітини розміщені з прогилежного боку капіляра, характеризуються потовщеною цитоплазмою і відсутністю мікроворсинок на люмінальній поверхні. Цитоплазма має ознаки набряку, мітохондрії деформовані з майже повною деструкцією крист. У цитоплазмі таких ендотеліоцитів знаходиться декілька великих лізосом з інтенсивно базофільним вмістом. Цитоплазма світла, піноцитозні міхурці майже відсутні. Перикапілярний прошарок (метаболічна зона), що прилягає до цього ендотеліоцита і межує з лактоцитом, перебуває в стані деструкції, дуже вузький. Базальна мембрана з обох боків має розпушену шльнгу пластинку, а зовнішня світла пластинка зливається з перивазальним простором.



Мал. 8.
Метаболічний простір (внизу) з піноцитозними міхурцями різних розмірів і форм. Зверху праворуч провіт альвеоли. 35, 9000x

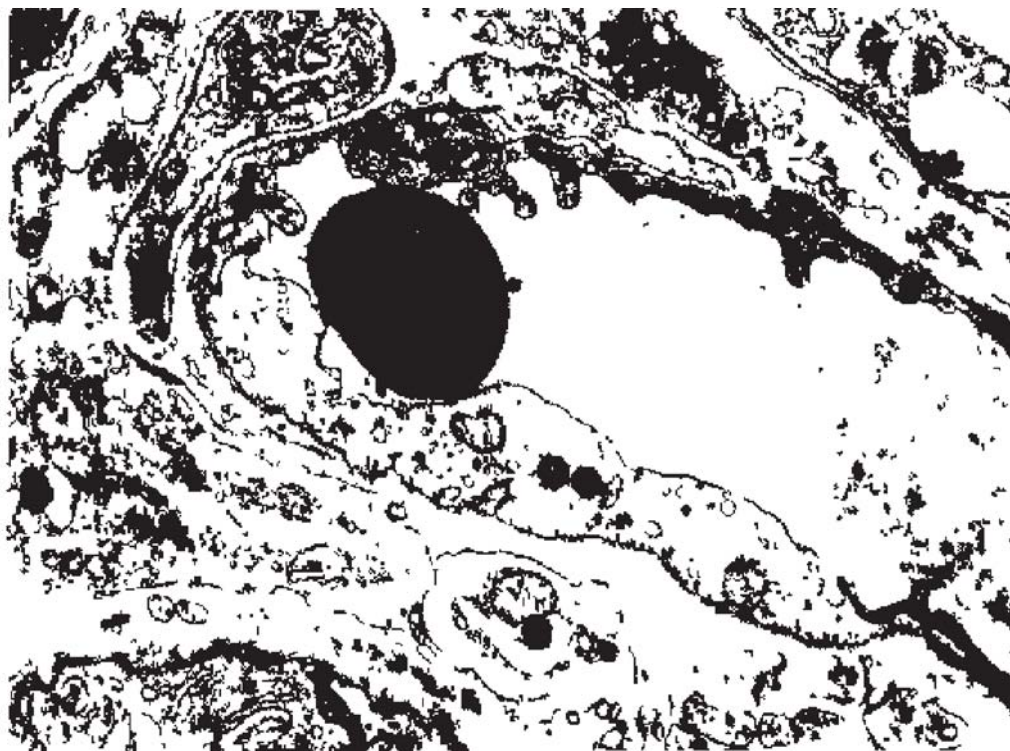
На другому етапі через 3-4 дні після відняття малят відзначається деградація лобуло-альвеолярного компартменту залози, місцева деструкція базальної мембрани і відрив лактоцитів. Вони виявляються в просвіті альвеол, де продовжується процес їх деструкції. При деградації базальної мембрани настає колапс альвеол і дестабілізація клітинних мембран. Наявність дериватів з збереженої частини лактоцита свідчить про те, що ця клітина функціонально малоактивна. Відмінність такої форми програмованої загибелі клітин від їх апоптозу полягає в тому, що тут процес починається з порушення міжклітинних зв'язків.

Одночасно в мікроемосудинах спостерігається набряк. Ядра ендотеліоцитів мають складки. Перинуклеарний простір відсутній. Цитоплазма ендотеліоцитів значно погвинчена. В таких ендотеліоцитах знаходиться мала кількість піноцитозних міхурців різних розмірів. В окремих кровеносних судинах трюфічного рівня настає деформація і апоптоз ендотеліоцитів, колапс та редукція капілярів.

На п'ятий день після відлучення малят спостерігається найбільш глибоке порушення структури лобуло-альвеолярних компонентів з ознаками колапсу. Деструкція лактоцитів продовжується в просвітах капілярів, деякі криноцити руйнуються *in situ*, починаючи з апікального полюса. Зростає число апоптозних тіл — обмежених плазмолемою утворів, які відзначаються чіткою маргінізацією хроматину з його мікрофрагментацією, відсутністю в каріолемі перинуклеарного простору. У цитоплазмі спостерігається розширення цистерн ендоплазматичної сітки, фрагментація мембранних утворів цитоплазми, утворення своєрідного кластера.

Означені зміни лобуло-альвеолярних комплексів супроводжуються регресією капілярного русла, настає своєрідний колапс капілярів. В окремих ендотеліоцитах спостерігається міграція хроматину з його мікрофрагментацією і маргінізацією, деструкція органел цитоплазми. У фагоцитах, що знаходяться в стінках альвеол, з'являється багато вторинних лізосом з інтенсивним осміофільним вмістом. У стромі залози з'являються активні фагоцити і кількість жирових клітин збільшується.

Отже, апоптоз лактоцитів служить причиною швидкої регресії капілярного русла. Кількість інтродуцтованих макрофагів в альвеолах збільшується, в них з'являється ліпофусцин. Макрофаги або залишаються в епітелії або мігрують в інтерстиціальну тканину, а відтак у регіональні лімфовузли. Характерним результатом інволюції залози є стиснення тканин без руйнування її базової архітектури.



Мал. 9.
Гемокapіляр: "темні" (зверху) і "ясні" (знизу) ендотеліоцити. У просвіті капіляра еритроцит. 36. 7000x

Під час підготовки до наступної лактації відбуваються зміни в базальних ясих клітинах залози. У них поступово збільшується кількість елементів ЕС і полісом, зростає кількість цистети і збільшуються їх розміри, мембрани ендоплазматичної сітки вкриваються полісомами. Ядро в малодиференційованих лактоцитах містить деконденсований хроматин, а перинуклеарний простір каріолеми рівномірно розширений. У цитоплазмі знаходиться майже виключно гранулярна ЕС, мітохондри дрібні, наближені до овальної форми, комплекс Гольджі складається з окремих диктіосом.

Перед народженням малят у молочній залозі самки альвеоли містять лактоцити різних рівнів зрілості і секреторної готовності. Переважають криноцити з добре розвиненим білоксинтезійним апаратом з малою кількістю дрібних білкових включень. У великих білкових гранулах містяться осміофільні мембраноподібні включення з ознаками деструкції цих утворів. Місцями в цитоплазмі альвеоцитів поряд з грубками гладкої ЕС виявляються скупчення ліпідних глобул.

Капіляри залоз у передродовий період добре розвинені. Їх ендотеліальні клітини в період підготовки до родів мають слабо розвинений синтезуючий і енергопродукуючий апарати. В ендотеліальних клітинах вирізняється мікроцітоцитозний комплекс, який має пряме відношення до транспортної функції. Періцити мають цільні відростки, які охоплюють капіляр. Зверху майже до кожного ендотеліоцита прилягає оточений базальною мембраною відросток періцита. Однак окремі тонші його ділянки можуть щільно прихвяти до ендотеліальної клітини. Перикаплярний простір має рівномірну ширину, містить мікрофібрилярні утвори, що проходять у різних напрямках з незначною щільністю.

Висновки

Узагальнюючи отримані нами результати досліджень та дані літератури, можна дійти висновку, що в молочній залозі здійснюються циклічні зміни секреторних клітин — лактоцитів. Відзначено такі перехідні форми лактоцитів: підготовчі, початкові, колостральні, білоксинтезійні, ліпидопродукційні, екструзивні та голокринові.

Під час секреторного процесу в залозі відбувається одночасна перебудова лактоцитів, мікротемосудин і перикаплярних, або альвеоло-гемосудинних простарків, які є своєрідними метаболічними зонами альвеол органу. За посередництва цих метаболічних зон здійснюється взаємодія між лактоцитами і гемосудинами трофічного рівня протягом секреторного циклу.

Коли кількість секреторних включень у криноцитах досягає певної критичної точки, настає голокринова секреція — клітина розпадається на секреторний детрит.

Після завершення лактаційного процесу молочна залоза підлягає екстенсивній тканинній реструктуризації, при якій відзначається щонайменше три стадії змін в органі. У першу чергу, під впливом апоптозіндукуючих факторів настає програмована смерть (апоптоз) окремих активних лактоцитів. На другій стадії має місце альтерація епітеліально-мезенхімних взаємовідносин з наступною деградацією екстраальвеолярного матриксу і деструкцією базальної мембрани. На останній стадії реструктуризації залози відзначається колапс альвеол і мікрогемосудин, які їх обслуговують, що завершується редукцією лобуло-альвеолярного компартменту залози. Однак зазначені процеси не призводять до тотальної деструкції базової архітектоники органа. Основою для ремоделювання функціональних структур молочної залози служать базальні ясні елітини часток, які є джерелом лактоцитного і міоепітеліального диферонів органа.

ЛІТЕРАТУРА

- 1 Дроник Г.В. Гормональна регуляція метаболічної активності молочної залози жуйних. Автореф дис . докт біол наук 03.00.13. Інститут біології тварин УААН. — Львів, 1994 — 48 с
- 2 Кудачков Ю.А. Изменение трансэндотелиального транспорта в микрососудах молочной железы в условиях функциональной гиперплазии и постлактационной инволюции органа // Патоморфология и клиническая патология сердца и сосудов. Ярославль, 1991 — 183 с
- 3 Furlong E E M , Keon N K , Thornton F.D et al. Expression of a 74-kDa nuclear 1 (NF1) protein is induced in mouse mammary gland involution. Involution-enhanced occupation of a twin NF1 binding element on the testosterone-repressed prostate message-2 (clusterin promoter) // J Biol Chem — 1996 — Vol 22(271), N 47 — P 1968-1997.
- 4 Heermeier K , Benedict M , Li M , Furth P., Nunez G , Henninghausen I. Bax and Bcl-x_s are induced at the onset of apoptosis in involuting mammary epithelial cells // Mech DeVol - 1996 - Vol 56, N 1-2 — P 197-207
- 5 Kaskaus S , Grun E , Mielkie H. Investigation on the composition of milk after artificial induction of lactation in 12 to 19 month old heifers // Berliner und Münchener Tierarztl Wochenschr. 1995 — Vol 108, N 9 — P 333-338
- 6 Le Roith, Neuschwander S , Wood J.L., Henninghausen I. Insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-3 inhibit involution of the mammary gland following lactation: studies in transgenic mice // Prog Growth Factor Res — 1995 — Vol.6, N 2 — P 4
- 7 Li M., Hu J., Heermeier K, Henninghausen I., Furth P.A. Apoptosis and remodeling of mammary gland tissue during involution proceeds through p-53-independent pathways// Cell Growth Differ — 1996. - Vol. 7, N 1 — P 13-20
- 8 Lund L.R., Rimer J , Thomasset N et al. Two distinct phases of apoptosis in mammary gland involution: proteinase-independent and -dependent pathways// Development — 1996. — Vol 122, N 1 — P 181-193
- 9 Marti A , Feng Z , Altermatt H.J , Jaggi R. Milk accumulation triggers apoptosis of mammary epithelial cells// Eur Cell Biol — 1997. — Vol. 73, N 2. — P 158-165
- 10 Marti A., Jehn B., Costello E. et al. Protein kinase A and AP-1(c-Fos/JunD) are induced during apoptosis of mouse mammary epithelial cells // Oncogene. — 1994 — Vol. 9, N 4 — P. 1213-1223.
- 11 Mc Kanna J A. Triproctin 1 in apoptosis: mammary regression // Anat. Rec — 1995 - Vol. 242, N 1. — P 1-10
- 12 Quernie L.H., Addey C., Vol. Wilde C.J. Apoptosis in lactating and involuting mouse mammary tissue demonstrated by nick-end DNA labeling // Cell Tissue Res — 1995 — Vol 281 N 3. — P 413-419
13. Srivastava M.D., Srivastava B I.S. Vascular endothelial growth factor in human milk// Medical — Science — Research — 1998 - - Vol 26, N 6 — P 419-421
- 14 Travers M F , Barber M.C. Gonner L. et al. The role of prolactin and growth hormone in the regulation of casein gene expression and mammary cell survival relationships to milk synthesis and secretion // Endocrinology — 1996. -- Vol 137, N 5 — P 1530-1539