

© А.Н. Яцковский, Т.В. Боронихина, 2006
УДК 612.43

А.Н. Яцковский и Т.В. Боронихина

ГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЛИКОПРОТЕИНОВ В БУЛЬБОУРЕТРАЛЬНЫХ ЖЕЛЕЗАХ ЧЕЛОВЕКА

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. — чл.-кор. РАМН проф. С.Л.Кузнецов) Московской медицинской академии им. И.М.Сеченова

В клетках концевых отделов и выводных протоков бульбоуретральных желез человека гистохимическими методами были выявлены нейтральные и кислые гликопротеины. Преобладающую часть кислых гликопротеинов во всех glanduloцитах составляли сиаломуцины. Сульфомуцины выявлялись в небольших количествах лишь в части концевых отделов. Гликоген в железах не обнаружен.

Ключевые слова: бульбоуретральные железы, гистохимия, гликопротеины.

Преобладающим компонентом секреторных продуктов железистых эпителиев являются гликопротеины, характер и соотношение которых в значительной мере определяют физико-химические и физиологические свойства секретов [3]. Гистохимические исследования гликопротеинов в бульбоуретральных железах (БУЖ) человека малочисленны и противоречивы [6, 11, 12]. Мнения авторов расходятся в вопросах о составе этих гликоконъюгатов, а также о возможности их синтеза различными отделами желез. Кроме того, исследования [11, 12] выполнены на материале, полученном от пациентов, оперированных по поводу рака мочевого пузыря или мочеоточника, что служит поводом к критической оценке результатов.

Цель работы — изучить состав гликопротеинов в секреторных клетках БУЖ половозрелых (I период зрелого возраста) здоровых мужчин.

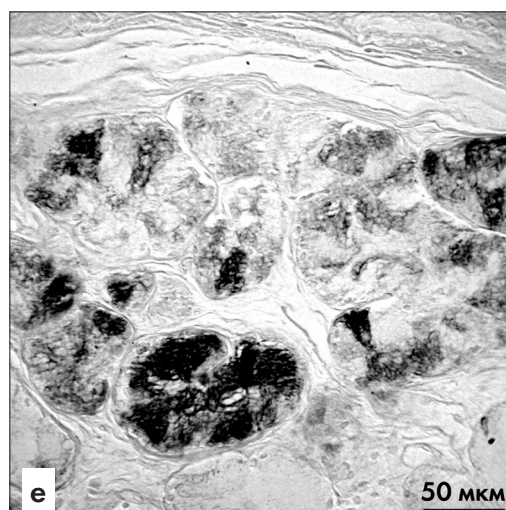
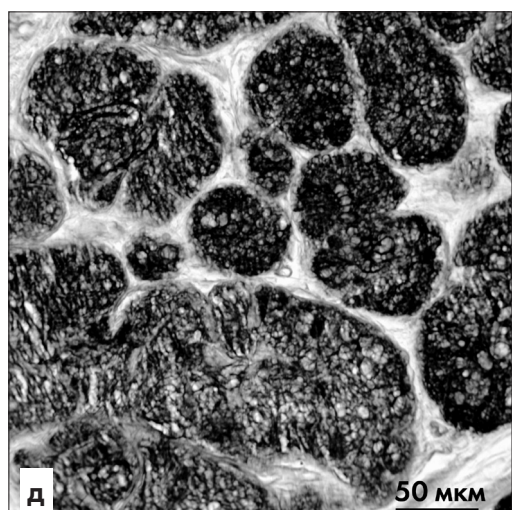
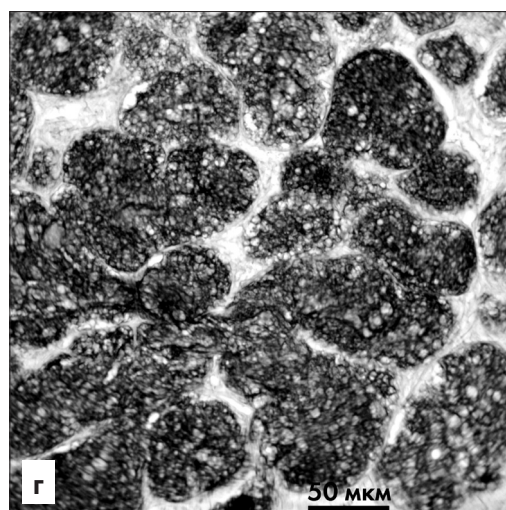
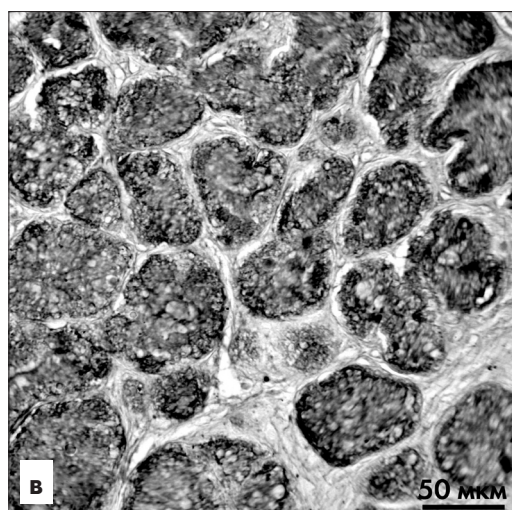
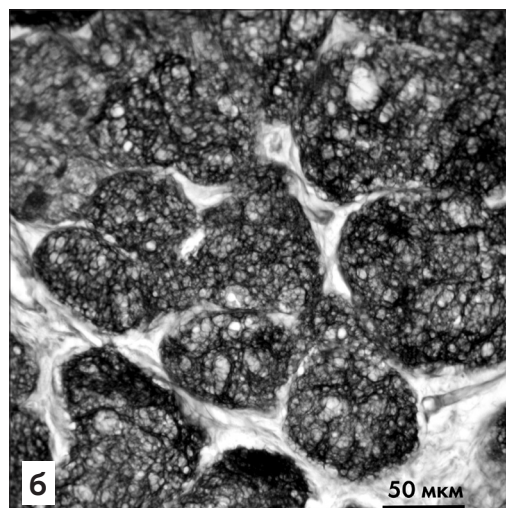
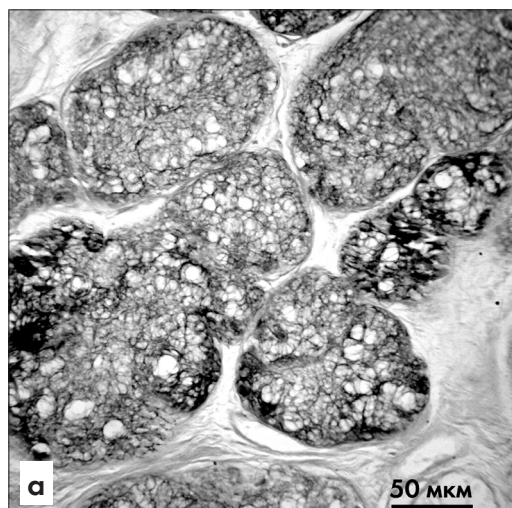
Материал и методы. Исследовали образцы желез мужчин, погибших от случайных причин в возрасте от 22 до 35 лет и не имевших признаков патологии органов малого таза (6 случаев). Материал фиксировали в 10% забуференном нейтральном формалине и заливали в парафин. Гликопротеины и гликоген выявляли с помощью гистохимических реакций, проведенных в соответствии со стандартными прописями [4]. Использовали: 1) ШИК-реакцию до и после обработки срезов диастазой, а также фенилгидразином — PAPS (periodic acid—phenylhydrazine—Schiff)-реакция [10]; 2) альциановый синий (АС) при значениях pH 2,5 и 1,0, после инкубирования срезов с нейраминидазой (*Vibrio cholerae*), а также с последующей ШИК-реакцией; 3) основной коричневый [1]. Срезы после ферментативного гидролиза либо обработки фенилгидразином и контрольные срезы окрашивали одновременно. Изменение интенсивности реакций оценивали по результатам денситометрии glanduloцитов, которую выполняли на аппаратно-программном комплексе «DiaMorph Cito» с использованием зеленого светофильтра при измерении оптической плотности Шифф-позитивных и оранжевого светофильтра — альцианофильных структур.

Средние величины оптической плотности получены в каждом случае по результатам измерений клеток 50 концевых отделов, локализованных в центральных и периферических участках железистых долек, и 10 выводных протоков. В срезах, окрашенных АС при pH 1,0, оценивали долю секреторных отделов с альцианофильными клетками из расчета на 1000 концевых отделов в каждом случае. Для сравнения средних величин использовали критерий Стьюдента.

Результаты исследования. ШИК-реакция. Характер распределения Шифф-позитивного материала был неодинаков в различных отделах желез. Терминальные части концевых отделов, расположенные по периферии долек, окрашивались более интенсивно по сравнению с участками, расположенными в центре долек рядом с выводными протоками. Во всех секреторных отделах glanduloциты окрашивались неоднородно (рисунк, б). В однослойном эпителии внутридольковых протоков реактивом Шиффа окрашивались только апикальные части клеток. В междольковых протоках и синусах, выстланных многослойным эпителием, окрашивание отмечалось преимущественно в покровных эпителиоцитах. Реакция секрета в протоках была положительной.

Диастаза + ШИК-реакция. Обработка срезов диастазой не влияла на интенсивность ШИК-реакции. Средние значения оптической плотности цитоплазмы до и после ферментативного гидролиза практически не различались и равнялись соответственно: в концевых отделах — $29,7 \pm 0,5$ и $30,6 \pm 1,6$, а в выводных протоках — $39,4 \pm 1,6$ и $39,6 \pm 1,4$.

PAPS-реакция. После обработки срезов фенилгидразином Шифф-позитивное окрашивание желез блокировалось не полностью (см. рисунок, а). В одних и тех же концевых отделах встречались клетки с разной интенсивностью окраски. Оптическая плотность цитоплазмы клеток в



Результаты гистохимических реакций на гликопротеины в концевых отделах бульбоуретральных желез половозрелых мужчин.

а — снижение интенсивности ШИК-реакции в срезе, обработанном фенилгидразином, в сравнении с контрольным срезом (б); в — частичное блокирование альцианофилии после гидролиза среза нейраминидазой в сравнении с контрольным срезом, окрашенным альциановым синим при pH 2,5 (г); д — окрашивание альциановым синим при pH 2,5 с последующей ШИК-реакцией — участки с преобладанием альцианофилии выглядят более плотными; е — избирательное окрашивание клеток альциановым синим при pH 1,0 в некоторых концевых отделах.

обработанных фенилгидразином срезах снизилась в секреторных отделах на 53% по сравнению с таковой на контрольных срезах, а в протоках и синусах — на 62%. Средние значения этого показателя составили в концевых отделах $12,02 \pm 0,24$ (в контроле — $25,4 \pm 0,4$; $P < 0,05$), а в протоках — $15,5 \pm 1,0$ (в контроле — $40,6 \pm 1,2$; $P < 0,05$).

АС при pH 2,5 + ШИК-реакция. Окраска цитоплазмы glanduloцитов варьировала от красно-фиолетовой (с преобладанием ШИК-реакции) до фиолетово-синей (с преобладанием альцианофилии) (см. рисунок, д). Клетки, имеющие исключительно Шифф-позитивное окрашивание, практически отсутствовали. В то же время, в центральных участках долек некоторые концевые отделы содержали только альцианофильные glanduloциты. Во внутридольковых протоках выявлялись одиночные либо расположенные группой клетки, апикальная часть цитоплазмы которых имела смешанное окрашивание. В эпителии междольковых протоков и синусов клетки поверхностного слоя, а также присутствующий в них секрет интенсивно окрашивались обоими красителями.

АС при pH 2,5. В большинстве секреторных отделов интенсивность окрашивания glanduloцитов была вариабельной (см. рисунок, г). В некоторых концевых отделах, лежащих рядом с выводными протоками, все клетки проявляли отчетливо выраженную альцианофилию. Во внутридольковых протоках апикальные части многих, но не всех, glanduloцитов содержали альцианофильный материал. В междольковых протоках окрашивались клетки поверхностного слоя, а также секрет.

Нейраминидаза + АС при pH 2,5. Гидролиз нейраминидазой снижал, но не блокировал полностью альцианофилию клеток концевых отделов и выводных протоков (см. рисунок, в). Средние значения оптической плотности цитоплазмы при ферментативном гидролизе и без него равнялись соответственно: в концевых отделах $2,09 \pm 0,05$ и $3,59 \pm 0,05$ ($P < 0,05$), в выводных протоках — $3,2 \pm 0,3$ и $5,4 \pm 0,6$ ($P < 0,05$). Снижение средней оптической плотности клеток протоков и концевых отделов после гидролиза было одинаковым и составило в обоих случаях 42%.

АС при pH 1,0. Положительно окрашенные клетки обнаруживались не во всех дольках БУЖ и лишь в части концевых отделов. Их относительное содержание составляло $34,8 \pm 1,0\%$. Интенсивность альцианофилии glanduloцитов, принадлежащих к одному секреторному отделу, варьировала от отчетливо выраженной до слабой (см. рисунок, е). В единичных концевых отделах

все клетки окрашивались одинаково интенсивно. Альцианофильные клетки встречались также в синусах желез. Секрет в протоках окрашивался позитивно.

Основной коричневый. Ни в одном из исследованных случаев положительной реакции в клетках БУЖ не отмечено. В междольковой соединительной ткани выявлялись тучные клетки.

Обсуждение полученных данных. В соответствии с номенклатурой [9, 13], гликопротеины секретов эпителиоцитов (муцины) подразделяются на нейтральные и кислые. Кислотные свойства последних определяются наличием COOH - и/или OSO_3H -групп. Поскольку свободные карбоксильные радикалы имеются в нейраминовых (сиаловых) кислотах, обнаружение COOH -групп биохимическими либо гистохимическими методами является свидетельством присутствия в тканях сиалосодержащих гликопротеинов (сиаломуцинов). Эстерифицированные сульфатные группы характерны для гексозаминов олигосахаридных цепей сульфатированных гликопротеинов (сульфомуцинов) [3, 8]. Степень ионизации OSO_3H -групп является основанием для выделения сульфомуцинов со слабо и сильно выраженными кислотными свойствами. Все перечисленные группы гликопротеинов, за исключением некоторых сильно кислых сульфомуцинов, а также гликоген могут давать положительную ШИК-реакцию [13]. Поэтому для дифференциального анализа гликоконъюгатов эта реакция используется в сочетании с различными процедурами блокирования или с дополнительными методами окрашивания.

В работе не было выявлено снижения интенсивности ШИК-реакции после инкубации срезов с диастазой. Это указывает на отсутствие гликогена в БУЖ человека, в отличие от аналогичных желез некоторых животных [5]. Вместе с тем, после обработки срезов фенилгидразином интенсивность ШИК-позитивного окрашивания желез изменялась. Фенилгидразин необратимо блокирует диальдегиды нейтральных гликопротеинов, образующиеся после перйодатного окисления, но не влияет на связывание с реактивом Шиффа альдегидных групп кислых гликопротеинов [10]. Поэтому установленное в работе снижение оптической плотности цитоплазмы клеток после PAPS-реакции свидетельствует о присутствии в БУЖ нейтральных муцинов. Поскольку падение оптической плотности было более выраженным в эпителиоцитах выводных протоков, можно полагать, что содержание нейтральных

муцинов в них выше, чем в секреторных отделах. Одновременно неполное блокирование фенол-гидразином ШИК-реакции указывает также на возможное присутствие в железах кислых гликопротеинов.

Для гистохимической идентификации в тканях одновременно кислых и нейтральных гликопротеинов используют окраску АС при pH 2,5 с последующей ШИК-реакцией. При таком сочетании потенциально ШИК-позитивные кислые гликопротеины предварительно связываются с АС и после перйодатного окисления срезов оказываются неспособными реагировать с реактивом Шиффа. В результате последующая ШИК-реакция выявляет только нейтральные гликопротеины [7]. Использование данной методики позволило уточнить локализацию муцинов разного типа в БУЖ.

Так, во всех концевых отделах периферических участков долек, а также в большинстве концевых отделов, расположенных в центре долек, glanduloциты окрашиваются в разных соотношениях обоими красителями и, следовательно, способны синтезировать в разных пропорциях и нейтральные, и кислые гликопротеины. Клетки некоторых концевых отделов, расположенных в центре долек, продуцируют только кислые муцины, о чем свидетельствует альцианофилия и отсутствие ШИК-позитивного окрашивания их цитоплазмы. В эпителиоцитах выводных протоков содержатся одновременно нейтральные и кислые муцины. Учитывая результаты PAPS-реакции, доля последних в клетках выводных протоков должна быть, вероятно, ниже. В других гистохимических исследованиях БУЖ человека [6, 11] гликопротеины в клетках протоков не были выявлены.

АС, являясь катионным красителем, одинаково прочно связывается с карбоксильными и сульфатными полианионами. Образование комплексов красителя с реакционноспособными группами гликопротеинов зависит от pH раствора и количества диссоциированных полианионов. АС при pH 2,5 окрашивает все кислые гликопротеины. При pH 1,0 альцианофильными являются слабо и сильно кислые сульфомуцины, поскольку карбоксильные группы сиаломуцинов остаются в этих условиях неионизированными [8].

Альцианофилия glanduloцитов в срезах, окрашенных АС при pH 2,5, подтверждает присутствие в железах кислых гликопротеинов. Клетки некоторых концевых отделов, расположенных вблизи выводных протоков и окрашивающихся наиболее интенсивно, содержат максимальное количество этих компонентов секрета. В остальных концевых

отделах вариabельность альцианофилии свидетельствует о неодинаковом содержании в клетках кислых муцинов. Аналогичная неоднородность окрашивания наблюдалась и после проведения ШИК-реакции, а также при совместном использовании обоих красителей. Возможным объяснением этому может быть различная способность glanduloцитов БУЖ к синтезу кислых муцинов или, что также вероятно, асинхронность функционирования клеток в пределах одного либо разных концевых отделов. Из полученных результатов следует, что в крупных междольковых протоках практически все клетки поверхностного слоя эпителия содержат кислые муцины, тогда как во внутридольковых протоках эти продукты вырабатывают лишь часть клеток.

Снижение альцианофилии после обработки срезов нейраминидазой указывает на присутствие в БУЖ гликопротеинов, содержащих сиаловые кислоты. Несомненно, что сиаломуцины, экстрагируемые нейраминидазой, составляют лишь часть вырабатываемых железами кислых гликопротеинов, поскольку ферментативный гидролиз не блокировал полностью связывание клетками АС при pH 2,5. С учетом этих результатов, имелись основания предполагать, что остаточная альцианофилия (около 60% от исходной) может быть связана с наличием в железах сиаломуцинов, резистентных к перевариванию нейраминидазой, либо сульфомуцинов, анионные группы которых также диссоциируют при указанном значении pH.

Для проверки последнего предположения было использовано окрашивание желез АС при pH 1,0. В этом случае альцианофильные клетки выявлялись лишь в отдельных концевых отделах и в синусах БУЖ, в то время как остаточную альцианофилию при pH 2,5 после ферментативного гидролиза демонстрировали практически все glanduloциты концевых отделов, а также эпителиоциты выводных протоков. Эти результаты указывают, во-первых, на возможность выработки сульфатированных гликопротеинов клетками некоторых концевых отделов и синусов БУЖ человека. Данный факт ранее не был установлен [11, 12]. Во-вторых, имеются основания считать, что остаточная альцианофилия после гидролиза нейраминидазой в значительной мере обусловлена присутствием в железах сиаломуцинов, устойчивых к действию фермента.

Сульфатированные гликопротеины, образующиеся в БУЖ, характеризуются, по-видимому, слабо выраженными кислотными свойствами. На это указывает отрицательное окрашивание желез основным коричневым, который выявляет пре-

имущественно сильно ионизированные сульфомуцины [2]. Отсутствие реакции клеток БУЖ с красителем не было следствием методических погрешностей, так как в соединительной ткани выявлялись положительно окрашенные тучные клетки.

Очевидно, что обнаруженные в БУЖ различные типы гликопротеинов включаются в состав их секрета, поскольку последний, находясь в просвете выводных протоков, проявлял при соответствующих методах окрашивания те же тинкториальные свойства, что и цитоплазма glanduloцитов.

Полученные факты позволяют предположить возможность существования в БУЖ человека клеток с разным фенотипом. Так, glanduloциты подавляющего большинства концевых отделов желез могут синтезировать в разных соотношениях нейтральные гликопротеины и сиаломуцины. Вместе с тем, клетки некоторых концевых отделов, расположенных в центральных участках долек, специализированы исключительно на выработке кислых гликопротеинов. В большинстве выводных протоков эпителиоциты также способны вырабатывать нейтральные и сиалированные гликопротеины. Однако содержание нейтральных муцинов в них больше, чем в эпителиоцитах концевых отделов желез. К отдельному фенотипу можно, по-видимому, отнести glanduloциты ряда концевых отделов и синусов, синтезирующие сульфомуцины и выявленные в железах в ограниченном количестве. Высказанное предположение требует дополнительного исследования так же, как и возможность относительно быстрого изменения процессов биосинтеза гликопротеинов и их состава в клетках БУЖ, обусловленного воздействием экзо- и эндогенных факторов регуляции их функциональной активности. Подобная возможность показана на примере других экзокринных желез [2].

Таким образом, установлено, что секрет БУЖ мужчин зрелого возраста содержит нейтральные и кислые гликопротеины. Кислые гликопротеины представлены преимущественно сиаломуцинами: сиалидазолабильными и сиалидазорезистентными. В меньших количествах в железах синтезируются сульфомуцины со слабо выраженными кислотными свойствами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шубич М.Г. Метод элективной окраски кислых (сульфатированных) мукополисахаридов основным коричневым. Бюл. экпер. биол., 1961, т. 51, № 2, с. 116–119.
2. Яцковский А.Н. Закономерности морфофункциональной организации дуоденальных желез (сравнительно-морфологическое и экспериментальное исследование): Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 1994.
3. Allen A. Structure of gastrointestinal mucus glycoproteins and the viscous and gel-forming properties of mucus. Brit. Med. Bull., 1978, v. 34, № 1, p. 28–33.
4. Bancroft J.D. and Cook H.C. Carbohydrates. In: Manual of Histological Techniques. Churchill, Livingstone, Edinburgh, 1984, p. 100–129.
5. Chrétien F.C. Les glandes bulbo-urétrales de Cowper et leur sécrétion: anatomie, propriétés physiques et rôles physiologiques. Contracept. Fertil. Sex., 1994, v. 22, № 4, p. 239–250.
6. Hellgren L., Mylius E. and Vincent J. The ultrastructure of the human bulbourethral glands. J. Submicrosc. Cytol., 1982, v. 14, № 4, p. 683–689.
7. Mowry R.W. The special value of methods that color both acidic and vicinal hydroxyl groups in histochemical study of mucins. Ann. N.Y. J. Acad. Sci., 1963, v. 106, № 2, p. 402–423.
8. Quintarelli G., Scott J.E. and Dellovo M.C. The chemical and histochemical properties of alcian blue. II. Dye binding of tissue polyanions. Histochemie, 1964, v. 4, № 2, p. 86–98.
9. Reid L. and Clamp J.R. The biochemical and histochemical nomenclature of mucus. Brit. Med. Bull., 1978, v. 34, № 1, p. 5–8.
10. Reid P.E., Dunn W.L., Ramey C.W. et al. Histochemical studies of the mechanism of the periodic acid-phenylhydrazine-Schiff (PAPS) procedure. Histochem. J., 1984, v. 16, № 6, p. 641–649.
11. Riva A., Sirigu P., Testa-Riva F. and Usai E. Fine structure and histochemistry of epithelial cells of the human bulbourethral glands. Acta. Anat., 1981, v. 111, № 1/2, p. 125–126.
12. Sirigu P., Turno F., Usai E. and Perra M.T. Histochemical study of the human bulbourethral (Cowper's) glands. Andrologia, 1993, v. 25, № 5, p. 293–299.
13. Spicer S.S., Leppi T.J. and Stoward P.J. Suggestions for a histochemical terminology of carbohydrate-rich tissue components. J. Histochem. Cytochem., 1965, v. 13, № 7, p. 599–603.

Поступила в редакцию 03.05.2006 г.

HISTOCHEMICAL ANALYSIS OF GLYCOPROTEINS IN HUMAN BULBOURETHRAL GLANDS

A.N. Yatskovskiy and T.V. Boronikhina

Neutral and acid glycoproteins were detected histochemically in the acinar and ductal cells of the bulbourethral glands. Most of acid glycoproteins in all the glandular cells could be identified as sialomucins. Small amounts of sulfomucins were demonstrated in some secretory acini. Glycogen was not detected in the glands.

Key words: *bulbourethral glands, histochemistry, glycoproteins.*

Department of Histology, Cytology and Embryology, Moscow I.M. Sechenov State Medical Academy.