

© Ю. Н. Вороник, Я. Р. Мацюк, 2018
УДК 611.342.018:612.65:613.81:599.323.4

Ю. Н. Вороник, Я. Р. Мацюк

МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ И ЦИТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭПИТЕЛИОЦИТОВ ДВЕНАДЦАТИПЕРСТНОЙ КИШКИ У 10- И 45-СУТОЧНОГО ПОТОМСТВА КРЫС, РАЗВИВАВШЕГОСЯ В УСЛОВИЯХ АНТЕНАТАЛЬНОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. — проф. С. М. Зиматкин), УО «Гродненский государственный медицинский университет», Республика Беларусь

Цель — выявить морфологические и цитохимические особенности эпителиоцитов ворсинок и крипт двенадцатиперстной кишки 10- и 45-суточного потомства крыс, развивавшегося в условиях антенатальной алкоголизации.

Материал и методы. С помощью гистологических, гистохимических и морфометрических методик изучены эпителиоциты ворсинок и крипт 16 крыс 10- и 45-суточного возраста, матери которых в течение всей беременности получали 15% раствор этанола. В качестве контроля использовали 16 крыс, рождённых от матерей, которые во время беременности употребляли воду.

Морфометрическими методами оценивали высоту эпителиоцитов, толщину щёточной каёмки, площадь и периметр их ядер. Гистохимическое исследование включало выявление и оценку содержания гликопротеинов, сиаломуцинов, РНП и активность щелочной и кислой фосфатаз и оксидоредуктаз.

Результаты. У подопытных животных выявлено снижение высоты эпителия ворсинок и крипт, уменьшение размеров ядер их эпителиоцитов, разнонаправленные изменения ряда цитохимических свойств эпителиоцитов, преимущественно в ворсинках.

Выводы. Антенатальная алкоголизация вызывает выраженные гистологические и цитохимические изменения в микроворсинчатых эпителиоцитах ворсинок и крипт двенадцатиперстной кишки, сохраняющиеся в постнатальный период.

Ключевые слова: двенадцатиперстная кишка, кишечные ворсинки, кишечные крипты, эпителиоциты, антенатальная алкоголизация

Проблема антенатального воздействия на потомство потребления алкоголя женщинами детородного возраста представляется важной и актуальной. При этом имеет значение не только число рождаемых детей, но и их качество жизни. Известно, что при пренатальной алкогольной интоксикации имеют место задержка роста, характерные изменения в нервной, эндокринной [13, 15, 16], сердечно-сосудистой [14], дыхательной [10], мочевой и половой [8] системах. Наблюдаются нарушения органов кроветворения и чувств [5, 9]. Употребление матерями во время беременности алкоголя вызывает у потомства повреждения желудочно-кишечного тракта. Известно, что в двенадцатиперстной кишке происходят активация пищеварительных ферментов, интенсивный гидролиз белков, жиров, углеводов, всасывание эпителиоцитами ворсинок и крипт продуктов гидролиза. Помимо этого, двенадцатиперстная кишка обладает важной функцией координатора моторной деятельности проксимальных и дистальных отделов пищеваритель-

ной трубки, экзокринной функции поджелудочной железы, желчеобразования и желчевыделения [1]. Учитывая важность данного отдела тонкой кишки в жизнедеятельности организма, нами была поставлена цель — выявить морфологические и цитохимические особенности эпителиоцитов ворсинок и крипт двенадцатиперстной кишки у 10- и 45-суточного потомства крыс, развивавшегося в условиях антенатальной алкоголизации.

Материал и методы. Исследование проведено на 32 крысах 10- и 45-суточного возраста с соблюдением требований, изложенных в Хельсинкской декларации о гуманном обращении с животными. На данное исследование получено разрешение комитета по биомедицинской этике Гродненского государственного медицинского университета (№ 1, от 05.01.2015 г.). Подопытными животными были 16 крыс, полученных от матерей, которые на протяжении всей беременности употребляли в качестве единственного источника питья 15% раствор этанола. Среднее потребление алкоголя беременными самками составляло 4 г/(кг•сут). В качестве контроля использовали 16 крыс, рождённых от матерей, которые во время беременности употребляли эквивалентное количество воды. Все самки контрольных

Сведения об авторах:

Вороник Юлия Николаевна (e-mail: Julia_nikol@mail.ru), Мацюк Ярослав Романович (e-mail: matsiuk39@mail.ru), кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии, УО «Гродненский государственный медицинский университет», Республика Беларусь, 230015, г. Гродно, ул. Горького, 80

и опытных групп и родившиеся от них потомство содержались в одинаковых условиях вивария.

Крыс контрольных и опытных групп по достижению ими 10- и 45-суточного возраста выводили из опыта лёгким эфирным наркозом с последующей декапитацией и забором после тщательного осмотра начальной части двенадцатиперстной кишки. Одни кусочки взятого материала фиксировали в жидкости Карнуа, охлаждённом ацетоне и заключали в парафин по принципу «контроль — опыт». Изготовленные на микротоме Leica RM 2135 (Германия) парафиновые срезы толщиной 5 мкм после окраски гематоксилином — эозином использовали для гистологических и морфометрических исследований. На срезах толщиной 10 мкм в эпителиоцитах определяли содержание гликопротеинов по Шабдашу, сиаломуцинов по Spicer, рибонуклеопротеинов (РНП) по Эйнарсону и щелочной фосфатазы по Гомори [12]. Другие кусочки подвергали глубокому замораживанию в жидком азоте. В срезах толщиной 10 мкм, изготовленных в криостате фирмы Leica CM 1850 (Leica Microsystems GmbH, Германия) при температуре -15°C , определяли в эпителиоцитах слизистой оболочки локализацию и активность дегидрогеназ: сукцината (СДГ; сукцинат: акцептор-оксидоредуктаза; КФ 1.3.99.1 по Нахласу и др., 1957), лактата (ЛДГ; L-лактат: НАД-оксидоредуктаза; КФ 1.1.1.27; по Гесс и др., 1958) и восстановленного НАДН (НАДН-ДГ; акцептор-оксидоредуктаза: КФ 1.6.93.3 по Нахласу и др., 1958). Все гистохимические реакции сопровождалась бессубстратными контролями [2]. Содержание в бокаловидных клетках гликопротеинов, сиаломуцинов и активность в щёточной каёмке эпителиоцитов щелочной фосфатазы оценивали визуально, а РНП, как и активность оксидоредуктаз, — цитофотометрически.

Изучение гистологических препаратов с последующим морфо- и цитофотометрическим анализом осуществляли с использованием микроскопа Axioskop 2 plus (Carl Zeiss, Германия), оснащённого цифровой камерой Leica DFC 320 (Leica, Германия). Для морфо- и цитофотометрической обработки использовали программу Image Warp (Bit Flow, США). Полученные цифровые данные обрабатывали методами непараметрической статистики с помощью компьютерной программы Statistica 6.0 для Windows. При обработке данных о значимости различий судили по двустороннему непараметрическому U-критерию Манна—Уитни. Результаты считали значимыми при $p < 0,05$. Данные представлены в виде Me (IQR), где Me — медиана, а IQR — интерквартильный раз-

мах. Морфометрические показатели выражались в микрометрах (мкм), а цитофотометрические — в единицах относительной плотности (ед. опт. пл.).

Результаты исследования. Исследованиями установлено, что пренатальная алкогольная интоксикация вызывает у родившегося потомства и достигшего 10-суточного возраста снижение высоты микроворсинчатых эпителиоцитов ворсинок двенадцатиперстной кишки на 14,71% ($p < 0,05$). Наблюдалась тенденция к уменьшению толщины их щёточной каёмки (таблица; рис. 1, а). При этом в цитоплазме эпителиоцитов имели место явления микро- и макровакуолизации, что приводило к снижению её тинкториальных свойств. Ядра эпителиоцитов сохраняли овальную форму, но имели меньшие размеры (достоверные уменьшения площади на 27,79% и периметра на 15,56%) по сравнению с контролем и часто располагались не на одном уровне. Нередко наблюдались инфильтрация лимфоцитами расширенных межклеточных пространств и увеличение просветов подэпителиальных кровеносных капилляров.

Крипты у подопытных крыс в сравнении с контрольной группой имели вид неупорядоченно расположенных небольших углублений. Высота их эпителиоцитов была уменьшена на 25,47%. Щёточная каёмка в эпителиоцитах крипт практически не просматривалась. Ядра имели округлую форму, плотно прилегали друг к другу. Как видно из таблицы, их площадь в сравнении с контролем была уменьшена на 27,27%, а периметр — на 14,87%. Ядра клеток Панета округлые, с неотчётливой структурой. Реже, чем в контроле, встречались бокаловидные и митотически делящиеся клетки.

Активность ферментов в эпителиоцитах ворсинок и крипт изменялась неоднозначно: значимо уменьшалась активность СДГ, а НАДН-ДГ прояв-

Морфометрические показатели эпителиоцитов двенадцатиперстной кишки у экспериментальных крыс в различные возрастные периоды (медиана и интерквартильный размах)

Показатели (мкм)	10-е сутки		45-е сутки	
	Контрольная группа	Подопытная группа	Контрольная группа	Подопытная группа
Высота эпителиоцитов ворсин	18,30 (4,78)	15,60 (0,63)*	24,92 (1,20)	21,07 (2,69)**
Толщина щёточной каёмки эпителиоцитов ворсин	1,27 (0,13)	1,09 (0,13)	1,58 (0,18)	1,32 (0,16)**
Площадь ядер эпителиоцитов ворсин, мкм^2	28,64 (7,86)	20,68 (1,88)**	31,60 (8,27)	25,56 (4,06)**
Периметр ядер эпителиоцитов ворсин	22,24 (3,60)	18,78 (1,82)**	23,31 (2,19)	19,97 (0,74)**
Высота эпителиоцитов крипт	12,21 (1,55)	9,10 (0,71)**	15,63 (4,45)	14,84 (3,27)
Площадь ядер эпителиоцитов крипт, мкм^2	23,14 (5,29)	16,83 (0,88)**	25,98 (4,68)	20,72 (1,90)**
Периметр ядер эпителиоцитов крипт	19,10 (2,16)	16,26 (0,78)**	20,10 (1,00)	17,70 (1,39)**

Здесь и на рис 2, 3: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ при сравнении крыс контрольных и подопытных групп.

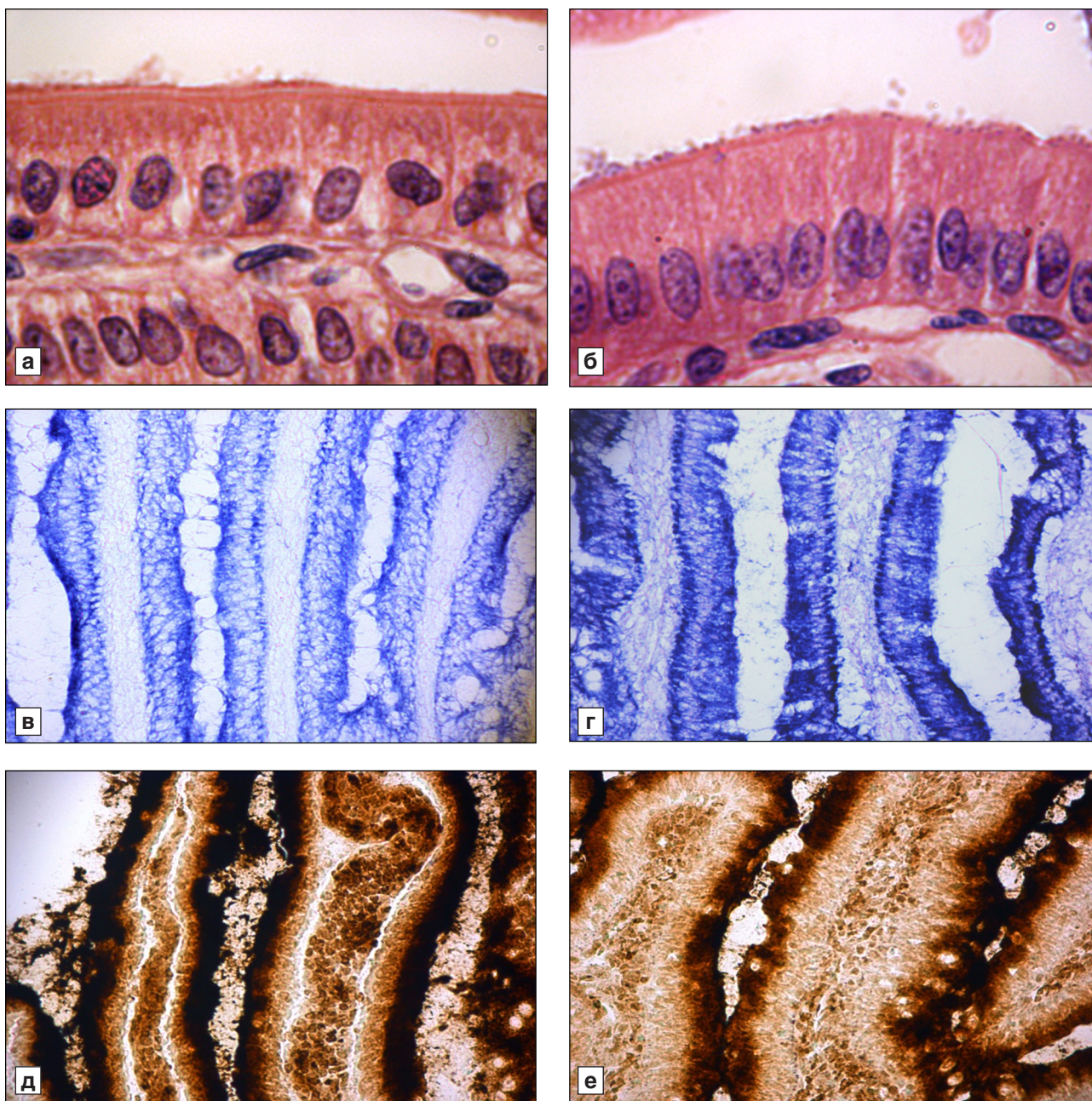


Рис. 1. Структурные и цитохимические особенности эпителиоцитов ворсинок двенадцатиперстной кишки у 10- и 45-суточных крыс, развивавшихся в условиях антенатальной алкоголизации.

а — снижение высоты микроворсинчатых эпителиоцитов и размеров их ядер у 10-суточных крыс; б — контроль; в — снижение активности сукцината в эпителиоцитах ворсинок у опытных 45-суточных животных; г — контроль; д — увеличение активности КФ (оксиредуктаз) в эпителиоцитах ворсинок у опытных 45-суточных животных; е — контроль. Окраска: а, б — гематоксилином — эозином; в, г — по Нахласу, Уокеру и Зелигману; д, е — по Гомори. Ув.: а, б — 1000; в, г, д, е — 200

ляла тенденцию к снижению, ЛДГ возрастала лишь в эпителиоцитах крипт, а КФ — в эпителиоцитах ворсинок (рис. 2). При этом продукты реакции становились крупноглыбчатыми, не всегда сохранялась полярность расположения, что приводило зачастую к нивелированию разницы в активности ферментов между апикальным и базальным отделами эпителиоцитов. Содержание гликопротеинов в бокаловидных клетках становилось меньше, мало их было и в поверхностном слое слизи.

Было низким в бокаловидных клетках и содержание сиаломуцинов, но их количество в слизистых наложениях в нижней трети ворсинок возрастало.

На 45-е сутки постнатального развития подопытных животных высота микроворсинчатых эпителиоцитов ворсинок продолжала быть сниженной на 15,45 % по сравнению с контролем. Их щётчатая каёмка отличалась меньшей оксифилией и сниженной на 16,46 % толщиной (см. таблицу). Однако явления вакуолизации в цитоплазме

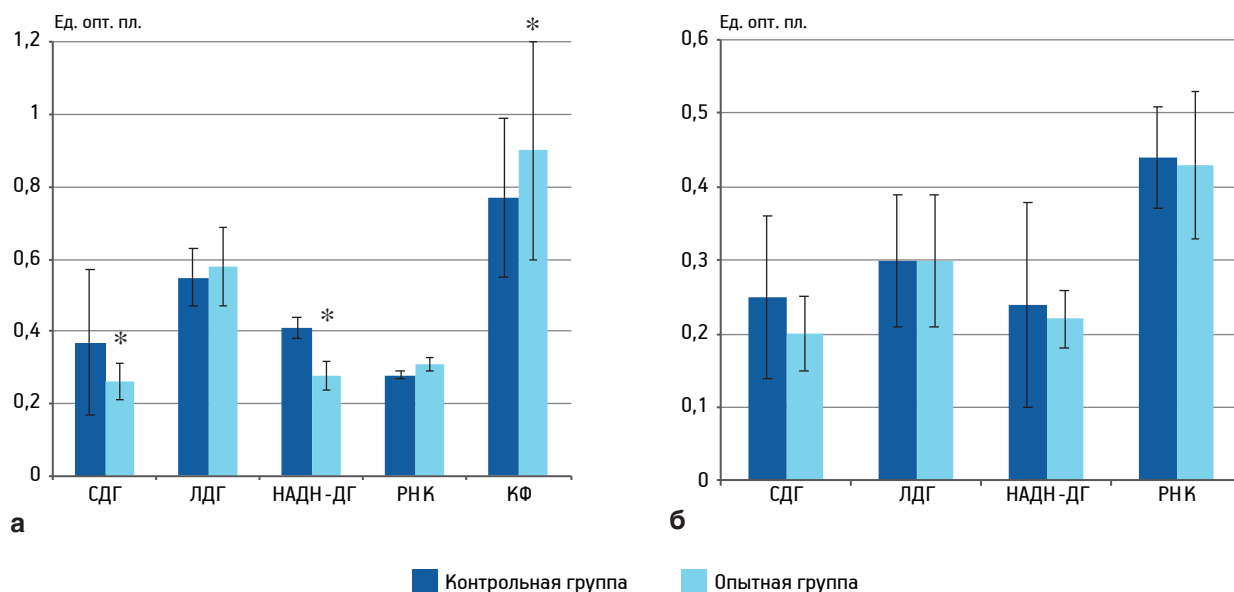


Рис. 2. Активность ферментов и содержание рибонуклеопротеинов (РНП) в эпителиоцитах ворсинок (а) и крипт (б) двенадцатиперстной кишки у 10-суточных животных.

Здесь и на рис. 3: СДГ — сукцинат; ЛДГ — L-лактат; НАДН-ДГ — акцептор-оксидоредуктаза; КФ — оксидоредуктазы; столбики — медиана. Вертикальные отрезки — интерквартильный размах

эпителиоцитов встречались реже, нежели на предыдущем сроке. Ядра по сравнению с 10-суточными животными приобретали овальную форму и располагались преимущественно ближе к базальному полюсу, но продолжали быть меньшего размера. Их площадь была меньше на 19,11%, а периметр — на 14,33% по сравнению с контролем. Несмотря на это, структура ядер просматривалась чётко: хроматин был в виде мелких глыбок, 1–2 ядрышка занимали как центральное, так и эксцентричное положение в кариоплазме. В межклеточных пространствах у базального полюса эпителиоцитов встречались лимфоциты. Среди эпителиоцитов заметно возрастало число бокаловидных клеток, апикальный полюс которых местами был переполнен секретом. Крипты удлинялись и приобретали вид длинных компактно расположенных трубочек. В межкриптной строме местами встречались расширенные гемокапилляры. Размер ядер эпителиоцитов был снижен по сравнению с контролем: площадь — на 20,25%, периметр — на 11,94% (см. таблицу). При этом надо отметить, что структура ядер просматривалась чётко. Чаше, как и среди эпителиоцитов ворсинок, встречались бокаловидные клетки, апикальные полюса которых нередко переполнялись секреторными гранулами. Среди микроворсинчатых эпителиоцитов крипт встречались митотически делящиеся клетки. Клетки Панета располагались в области доньшек крипт в виде клеточного конгломерата. Апикальные полюса клеток ввиду

обильной вакуолизации приобретали пенистый вид.

В эпителиоцитах ворсинок цитофотометрически установлено значимое уменьшение активности СДГ и НАДН-ДГ и возрастание КФ (см. рис. 1, в, д; рис. 3). Однако характер и полярированность распределения продуктов реакции не отличались от таковых в контроле. Гликопротеины и сиаломуцины в большом количестве выявлялись в бокаловидных клетках, расположенных в верхней трети крипт, а в бокаловидных клетках ворсинок их содержание было меньшим. Данные биополимеры в обилии выявлялись в поверхностной слизи, что говорит об интенсивной фазе их экстрезии. Сульфомуцины в небольшом количестве в основном определялись в бокаловидных клетках крипт и поверхностном слое слизи, покрывающей ворсинки. Помимо этого, они обнаруживались в гранулах тучных клеток, обильно встречаемых в строме слизистой оболочки вблизи гемокапилляров.

Обсуждение полученных данных. В результате эксперимента было установлено, что введение беременным крысам 15% раствора этанола из расчёта 4 г/(кг·сут), приводит к развитию морфологических и цитохимических изменений в микроворсинчатых эпителиоцитах ворсинок и крипт у их потомства. Можно полагать, что ведущую роль в возникновении выявленных изменений сыграло токсическое воздействие самого алкоголя и его метаболитов, особенно ацетальде-

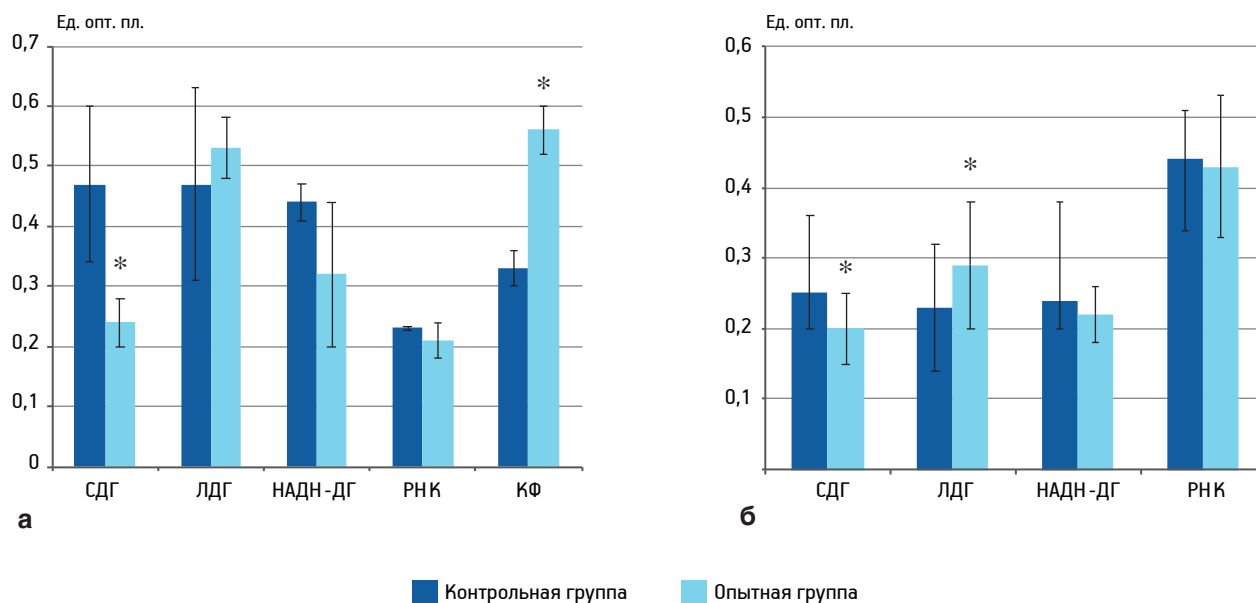


Рис. 3. Активность ферментов и содержание рибонуклеопротеинов в эпителиоцитах ворсинок (а) и крипт (б) двенадцатиперстной кишки у 45-суточных животных

гида [12]. Они свободно проникают через гемато-плацентарный барьер и оказывают повреждающее действие [7]. Наиболее выраженный эмбриотоксический эффект этанол и особенно ацetalдегид дают в период интенсивного деления клеток плода. В этой связи наиболее опасным периодом беременности в плане возникновения повреждений развивающегося организма является I триместр, когда происходит процесс органогенеза зародыша, и его клетки наиболее уязвимы к действию повреждающих факторов [11]. Токсическое воздействие алкоголя в первые 3 нед беременности приводит к «клеточной смерти», сопровождающейся грубыми пороками развития внутренних органов плода и часто является причиной его внутриутробной гибели [4].

В нашем исследовании было установлено снижение высоты микроворсинчатого эпителия слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки, размеров его ядер, наличие цитохимических изменений в цитоплазме эпителиоцитов. Эти изменения могут стать причиной функциональных нарушений в тонкой кишке крыс [6], уменьшении её массы, длины и моторики у антенатально алкоголизированных животных [3, 6], что имеет отдаленные негативные последствия для всего организма.

Таким образом, антенатальная алкоголизация вызывает выраженные гистологические и цитохимические изменения в микроворсинчатых эпителиоцитах ворсинок и крипт двенадцатиперстной кишки, которые, вероятно, могут остаться

и на более поздних сроках постнатального развития.

Вклад авторов:

Концепция и дизайн исследования: Я. Р. М.

Сбор и обработка материала: Ю. Н. В.

Статистическая обработка данных: Ю. Н. В.

Анализ и интерпретация данных: Ю. Н. В., Я. Р. М.

Написание текста: Ю. Н. В.

Редактирование: Я. Р. М.

Авторы сообщают об отсутствии в статье конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лысиков Ю.А. Фундаментальные механизмы пищеварения // Медицинский алфавит. Практическая гастроэнтерология. 2015. Т. 3, № 16. С. 17–27 [Lysikov Yu.A. Fundamental mechanisms of digestion // Meditsinskii alfavit. Prakticheskaya gastroenterologiya. 2015. Vol. 3, № 16. P. 17–27. In Russ.].
2. Пирс Э. Гистохимия теоретическая и прикладная. М: Иностранная литература, 1962. 962 с. [Pearse E. Gistohimiya teoreticheskaya i prikladnaya. Moscow: Inostrannaya literatura, 1962. 962 p.].
3. Bhalla S., Mahmood S., Mahmood A. Effect of prenatal exposure to ethanol on postnatal development of intestinal transport functions in rats // Eur. J. Nutr. 2004. Vol. 43, № 2. P. 109–115.
4. Cartwright M.M., Tessmer L.L., Smith S.M. Ethanol-induced neuronal death in organotypic cultures of rat cerebral cortex // Alcohol. Clin. Exp. Res. 1998. Vol. 22. P. 142–149.
5. Church M.W., Hotra J.W., Holmes P.A. et al. Auditory brainstem response (ABR) abnormalities across the life span of rats prenatally exposed to alcohol // Alcohol. Clin. Exp. Res. 2012. Vol. 36. P. 83–96.
6. Estrada G., Krasinski S.D., Rings E.H.H.M. et al. Prenatal ethanol exposure alters the expression of intestinal hydrolase

- mRNAs in newborn rats // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 1996. Vol. 20, № 9. P. 1662–1668.
7. Gordon B.H., Streeter M.L., Rosso P. et al. Prenatal alcohol exposure: abnormalities in placental growth and fetal amino acid uptake in the rat // *Biol. Neonate.* 1985. Vol. 47, № 2. P. 113–119.
 8. Gray S.P., Cullen-McEwen L.A., Bertram J.F. et al. Mechanism of alcohol-induced impairment in renal development: could it be reduced by retinoic acid // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2012. Vol. 39, № 9. P. 807–813.
 9. Gummel K., Ygge J., Benassi M. et al. Motion perception in children with foetal alcohol syndrome // *Acta Paediatr.* 2012. Vol. 101. P. 327–332.
 10. Kervern M., Dubois Ch., Naassila M. et al. Perinatal alcohol exposure in rat induces long-term depression of respiration after episodic hypoxia // *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 2009. Vol. 179, № 7. P. 608–614.
 11. Mattson S.N., Riley E.P. *Fetal Alcohol Syndrome: From Mechanism to Prevention.* Washington: CRC Press, 1996. 148 p.
 12. Miller M.W. Limited ethanol exposure selectively alters the proliferation of precursor cells in the cerebral cortex // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 1996. Vol. 20. P. 139–143.
 13. Niimi Y. Fetal alcohol syndrome (FAS) // *Ryoikibetsu Shokogun Shirizu.* 2003. Vol. 40. P. 412–416.
 14. Ramadoss J., Magness R.R. Vascular effects of maternal alcohol consumption // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2012. Vol. 303, № 4. P. 414–421.
 15. Ramadoss J., Tress U., Chen W.-J.A. et al. Maternal adrenocorticotropin, cortisol, and thyroid hormone responses to all three-trimester equivalent repeated binge alcohol exposure: ovine model // *Alcohol.* 2008. Vol. 42, № 3. P. 199–205.
 16. Wilcoxon J.S., Redei E.E. Prenatal programming of adult thyroid function by alcohol and thyroid hormones // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2004. Vol. 287, № 2. P. 318–326.

Поступила в редакцию 23.11.2017
Получена после доработки 01.02.2018

MORPHOMETRIC AND CYTOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF THE DUODENAL EPITHELIOCYTES IN 10- AND 45 DAYS-OLD OFFSPRING OF RATS DEVELOPING UNDER CONDITIONS OF ANTENATAL ALCOHOLIZATION

Yu. N. Voronik, Ya. R. Matsyuk

Objective — to study the morphological and cytochemical characteristics of the duodenal epitheliocytes of villi and crypts in 10- and 45-day offspring of rats developing under conditions of antenatal alcoholization.

Materials and methods. The structure of the duodenal mucosa was examined in 15 rats aged 10 and 45 days that were born from the mothers which received 15% ethanol solution during the whole pregnancy. 16 rats born from the mothers that drank water during their pregnancy, served as a control.

Morphometric methods were used to evaluate the height of the epithelial cells, the thickness of the brush border, the area and perimeter of the nuclei. Histochemical study included the demonstration and the assessment of glycoprotein, sialomucine, RNP content as well as of alkaline, acid phosphatase and oxidoreductases activities.

Results. A decrease of the height of the epithelium of villi and crypts was detected in experimental animals, together with a reduction in the size of nuclei of their epitheliocytes. Cytochemical parameters demonstrated multidirectional changes, mainly in the epithelial cells of the villi.

Conclusions. Antenatal alcoholization causes significant histological and cytochemical changes in the microvillous epithelial cells of the duodenal villi and crypts that persist during the postnatal period.

Key words: *duodenum, intestinal villi, intestinal crypts, epitheliocytes, antenatal alcoholization*

Department of Histology, Cytology and Embryology, Grodno State Medical University, 80 Gorkiy Str., Grodno, 230015 Belarus