

© О. Ю. Серышева, Г. В. Брюхин, 2013
УДК 611.342.018.7:612.65:599.323.4

О. Ю. Серышева и Г. В. Брюхин

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭПИТЕЛИЯ КРИПТ ДВЕНАДЦАТИПЕРСТНОЙ КИШКИ У ПОТОМСТВА САМОК КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ПОРАЖЕНИЕМ ПЕЧЕНИ

Кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии (зав. — проф. Г. В. Брюхин), Южно-Уральский государственный медицинский университет, г. Челябинск

Изучены количественные характеристики и качественный состав эпителия крипт слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки у 90 крыс Вистар на 1–60-е сутки жизни — потомства самок с экспериментальным D-галактозаминным поражением печени. Гистологические срезы окрашивали гематоксилином — эозином, толуидиновым синим — для выявления бокаловидных клеток, импрегнировали нитратом серебра для выявления эндокринных клеток. Определяли линейные размеры кишечных крипт (длину и ширину на продольных срезах). Подсчитывали общее количество эпителиоцитов, микроворсинчатых, эндокринных, бокаловидных клеток, внутриэпителиальных лимфоцитов из расчета на продольный срез крипты. Измеряли линейные размеры (длину, ширину) микроворсинчатых энтероцитов, вычисляли объем их ядер. У подопытных животных по сравнению с контрольными (потомство intactных матерей, n=90) линейные размеры крипт не изменялись. У них выявлено увеличение количества микроворсинчатых, бокаловидных и эндокринных клеток, наряду с уменьшением размеров микроворсинчатых клеток и объема их ядер. Одновременно у этих животных отмечено увеличение гиперхромности ядер эпителиальных клеток и количества интраэпителиальных лимфоцитов.

Ключевые слова: двенадцатиперстная кишка, крипта, эпителий, поражение печени

Одним из факторов, определяющих реактивность и резистентность организма, является морфофункциональное состояние пищеварительной системы [11, 12]. В ходе экспериментальных исследований было выявлено влияние поражения печени матери на морфофункциональные характеристики пищеварительного тракта потомства. В частности, было показано нарушение функционального становления экзокринного и эндокринного аппаратов поджелудочной железы [3], лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистой оболочкой кишечника их потомства [2], а также на морфофункциональные характеристики тучных и эндокринных клеток слизистой оболочки тонкой кишки [6].

Слизистая оболочка кишечника — уникальный барьер, который, с одной стороны, обеспечивает защиту от нежелательного вторжения микроорганизмов, а с другой — обладает высокой проницаемостью для нутриентов, микроэлементов, витаминов [10–12, 16]. Во многом данная функция зависит от состояния эпителия, выстилающего слизистую оболочку [10, 14]. Эпителий крипт, кроме того, является источником регенерации эпителиоцитов кишечника [8, 15]. Исходя из этого, цель настоящего исследования — анализ

особенностей морфофункциональных характеристик эпителия крипт двенадцатиперстной кишки потомства самок-крыс с экспериментальным поражением печени.

Материал и методы. В эксперименте были использованы белые лабораторные крысы-самки линии Вистар их потомство (76 животных из 30 пометов) на 1-, 15-, 30-, 45-е и 60-е сутки. Данные сроки исследования согласуются с общепризнанным подразделением возрастных периодов у крыс: период новорожденности (1–5-е сутки), подсосный период (6–21-е сутки), период полового созревания (22–50-е сутки) и период половой зрелости (с 51-х суток). Крысам-самкам моделировали острое поражение печени, для чего им под эфирным наркозом однократно внутривентриально вводили D-галактозамин гидрохлорид (Sigma, США) в 0,9% растворе натрия хлорида в дозе 250 мг/кг массы тела. Экспериментальный гепатит, вызываемый введением животным D-галактозамина, по своим морфологическим, гистологическим и биохимическим характеристикам рассматривается как адекватная модель вирусного гепатита В у человека [7]. Через 10 сут после введения препарата к самкам подсаживали здоровых самцов. В качестве контрольной группы было взято потомство от intactных самок (90 крысят из 24 пометов). Распределение экспериментальных животных по группам представлено в *табл. 1*. Работа была проведена в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием лабораторных животных». Декапитацию животных проводили под эфирным наркозом.

Сведения об авторах:

Серышева Олеся Юрьевна (e-mail: 22kiti22@mail.ru), Брюхин Геннадий Васильевич (e-mail: kanc@chelsma.ru), кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии, Южно-Уральский государственный медицинский университет, 454092, Челябинск, ул. Воровского, 64

Таблица 1

Распределение животных по группам

Возраст, сутки	Количество животных	
	Контрольная группа	Подопытная группа
1-е	15	15
15-е	14	17
30-е	19	22
45-е	19	11
60-е	23	11
Всего	90	76

Исследовали начальный отдел двенадцатиперстной кишки. Выделенный материал фиксировали в жидкости Буэна. Серийные поперечные гистологические срезы толщиной 5–6 мкм окрашивали гематоксилином — эозином, импрегнировали нитратом серебра по Гримелиусу в модификации А. П. Никонова [4] для выявления эндокринных клеток дисперсной эндокринной системы, окрашивали 0,1% раствором толудинового синего для выявления бокаловидных клеток.

Для морфометрического исследования был использован программно-аппаратный комплекс для анализа обработки изображений в микроскопии (Jenoptik, Германия), состоящий из тринокулярного микроскопа Motic BA-400 T, цифровая цветная система ввода изображений на базе цифровой камеры ProgRes C3, 1/1.8" высокого разрешения не менее 2080×1542 и лицензионного программного обеспечения «Видео Тест — Морфология 5.0».

Морфометрическое исследование осуществляли на всем поперечном срезе органа при об. 40, ок. 10. Исследовали линейные размеры кишечных крипт (длину и ширину крипт на их продольных срезах). Подсчитывали общее количество эпителиоцитов, количество одиночных эндокринных клеток, бокаловидных клеток, внутриэпителиальных лимфоцитов из расчета на продольный срез крипты, изучали линейные размеры (высоту, ширину) микроворсинчатых энтероцитов, вычисляли объем их ядер по формуле эллипсоида: $V = \pi L B^2 / 6$, где L и B — больший и меньший диаметры ядра (в мкм³).

Статистическую обработку проводили на персональном компьютере с помощью пакета прикладных программ «Statistica 6.0» («StatSoft, Inc.»). При обработке полученных результатов использовали методы вариационной статистики (определение среднего арифметического и его стандартной ошибки). Значимость различий оценивали с помощью непараметрического критерия Манна—Уитни. При этом значимыми считали различия при $P < 0,05$.

Результаты исследования. В ходе проведения эксперимента были выявлены следующие закономерности.

У крысят в криптах слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки количество различных разновидностей эпителиоцитов после рождения с

возрастом постепенно увеличивается и достигает максимального значения к периоду половой зрелости (табл. 2). При этом в крипах у крыс подопытной группы количество микроворсинчатых и бокаловидных (рисунков, а, б) клеток значительно превышает таковое в контроле на 30–45-е сутки, а эндокринных клеток — на 30–60-е сутки (см. рисунок, в, г; табл. 2). Проведенный анализ длины и ширины кишечных крипт значимых различий в опыте и контроле не выявил.

При исследовании размеров микроворсинчатых эпителиоцитов крипт было обнаружено, что у всех животных после рождения отмечается постепенное увеличение высоты и ширины эпителиоцитов, достигающей максимального значения к периоду половой зрелости (табл. 3). При этом в некоторые сроки исследования данные показатели у потомства самок крыс с D-галактозаминным поражением печени оказались ниже, чем в контрольных образцах (см. табл. 3).

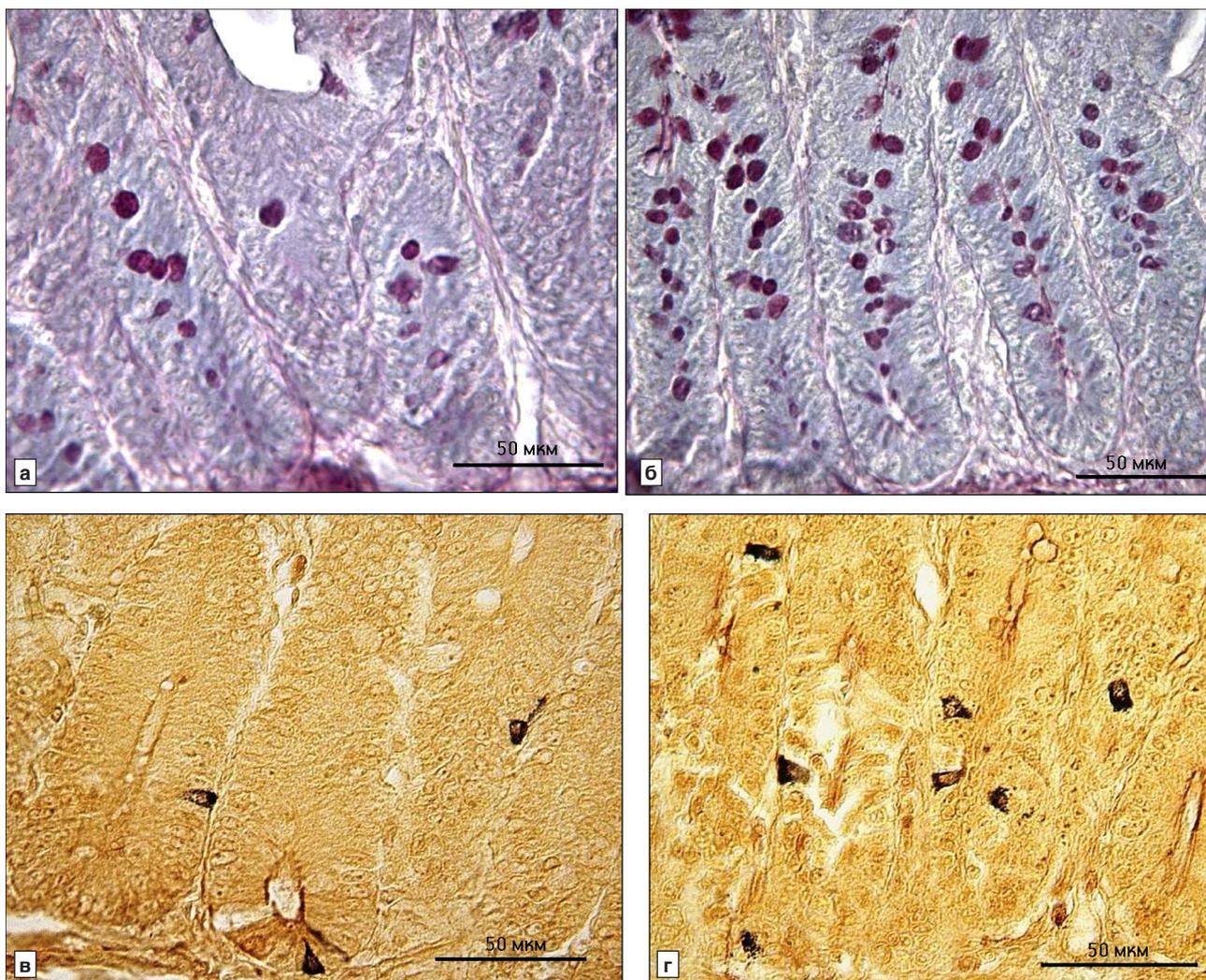
У интактных крысят после рождения объем ядер микроворсинчатых клеток крипт постепенно увеличивается и достигает максимального значения к периоду половой зрелости (см. табл. 3).

Таблица 2

Клеточный состав эпителия крипт слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки у потомства интактных (контроль) крыс и с экспериментальным острым поражением печени ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Группа животных	Возраст, сутки	Количество клеток на продольном срезе крипты			
		микроворсинчатых	бокаловидных	эндокринных	лимфоцитов
Контрольная	1-е	27,2±0,6	1,7±0,3	0,690±0,022	1,42±0,13
	15-е	32,9±1,1	4,4±0,4	0,830±0,012	4,1±0,5
	30-е	39,8±1,6	5,6±0,8	0,98±0,08	5,3±1,0
	45-е	44,8±2,0	7,9±1,0	1,020±0,023	6,5±1,4
	60-е	56,3±2,4	8,2±1,2	0,740±0,012	6,6±1,6
Подопытная	1-е	26,6±0,7	1,79±0,28	0,730±0,019	1,54±0,4
	15-е	4,0±1,3	4,8±0,5	0,840±0,021	4,9±0,4
	30-е	45,7±1,1*	10,2±0,9*	1,32±0,03*	9,6±1,1*
	45-е	53±1,8*	11,1±1,3*	1,210±0,011*	12,4±1,2*
	60-е	59,6±2,2	10,6±1,4	0,810±0,015*	14,1±1,5*

* Здесь и в табл. 3: различия значимы по сравнению с контролем при $P < 0,05$.



Крипты двенадцатиперстной кишки intactных 30-суточных крыс, родившихся у intactных (контроль) самок (а, в) и у самок с экспериментальным острым поражением печени (б, г).

а — бокаловидные клетки; б — количество бокаловидных клеток увеличено по сравнению с контролем; в, г — эндокринные клетки.
а, б — окраска толуидиновым синим; в, г — импрегнация нитратом серебра по Гримелиусу в модификации А. П. Никонова [4]

Таблица 3

Характеристика микроворсинчатых эпителиоцитов крипт слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки у потомства intactных (контроль) крыс и с экспериментальным острым поражением печени ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Группа животных	Возраст, сутки	Объем ядра, $\mu\text{м}^3$	Высота, $\mu\text{м}$	Ширина, $\mu\text{м}$
Контрольная	1-е	$3,0 \pm 1,0$	$5,1 \pm 0,7$	$37,6 \pm 1,3$
	15-е	$12,7 \pm 0,7$	$5,4 \pm 0,6$	$36,7 \pm 1,3$
	30-е	$18,4 \pm 1,0$	$6,48 \pm 0,14$	$39,7 \pm 1,6$
	45-е	$18,3 \pm 2,3$	$6,86 \pm 0,16$	43 ± 3
	60-е	$22,9 \pm 1,1$	$6,91 \pm 0,18$	49 ± 4
Подопытная	1-е	$13,1 \pm 0,6$	$5,06 \pm 0,25$	$36,4 \pm 0,7$
	15-е	$12,4 \pm 0,9$	$5,4 \pm 0,7$	$33,8 \pm 1,3$
	30-е	$12,9 \pm 1,0^*$	$5,34 \pm 0,05^*$	$34,5 \pm 1,2^*$
	45-е	$14,8 \pm 0,9^*$	$5,07 \pm 0,26^*$	$33,0 \pm 2,4^*$
	60-е	$21,3 \pm 1,5$	$6,21 \pm 0,22$	$46,8 \pm 2,5$

У подопытных крысят после рождения объем ядер микроворсинчатых энтероцитов крипт снижается с периода новорожденности до конца периода полового созревания, а затем увеличивается и достигает максимального значения в период полового созревания. Обращает на себя внимание то, что в большинстве сроков исследования объем ядер микроворсинчатых эпителиоцитов крипт снижен по сравнению с таковым в контроле. Кроме того, выявлена гиперхромность ядер эпителиальных клеток крипт по сравнению с контролем.

Обсуждение полученных данных. Слизистая оболочка тонкой кишки образует ворсинки и крипты, на поверхности которых находится слой поляризованного эпителия, составляющий раздел между просветом кишечника (внешней средой) и соединительной тканью (внутренней средой) [10]. В пласте этого эпителия между энтероцитами распределены другие клетки, в том числе эндокринные, бокаловидные клетки, а также лимфоциты [11]. Клетки эпителия ворсинок кишки обеспечивают функцию пристеночного терминального пищеварения, абсорбцию воды, электролитов [16], обладают хорошо развитой секреторной способностью [14].

В проведенном исследовании у потомства самок крыс с экспериментальным D-галактозаминовым поражением печени, в первую очередь было обнаружено повышение количества эпителиоцитов в криптах слизистой оболочки. Поскольку абсолютные размеры элементов рельефа у подопытных животных не изменялись, мы провели измерение линейных размеров эпителиоцитов, которое выявило снижение высоты и ширины микроворсинчатых эпителиоцитов.

Параллельно с уменьшением размеров клеток эпителия обнаружено уменьшение объема ядер микроворсинчатых эпителиоцитов и выявлена их гиперхромность по сравнению с таковыми в контроле. Последняя, возможно, свидетельствует о преобладании функционально неактивного гетерохроматина по сравнению с деспирализованным и потому светлым эухроматином. Эти данные могут свидетельствовать о сниженной функциональной активности эпителиоцитов [9].

Снижение размеров клеток, наряду с уменьшением объема ядер и их гиперхромностью, встречается также при дисрегенераторных процессах, при активации пролиферации клеток [1, 8, 15]. На усиление пролиферации также косвенно указывает повышение количества внутриэпителиальных лимфоцитов в слизистой оболочке двенадцатиперстной кишки в те же сроки. По мнению некоторых авторов, лимфоцитарная инфильтра-

ция эпителия слизистой оболочки может отражать участие лимфоцитов в регуляции клеточного обновления [1, 13]. В эпителии с признаками активной пролиферации наблюдается наиболее выраженная инфильтрация, что расценивается как способность лимфоцитов к передаче так называемой регенераторной информации [15].

В основании крипт находятся стволовые клетки, которые способны к самообновлению и, в то же время, из них дифференцируются четыре линии эпителиальных клеток кишечника: микроворсинчатые, бокаловидные, энтероэндокринные клетки и клетки Панета [8]. В нашем исследовании, параллельно с увеличением количества микроворсинчатых эпителиоцитов, было обнаружено также увеличение числа эндокринных и бокаловидных клеток, что косвенно подтверждает предположение об усилении пролиферативных процессов эпителия кишечной крипты и может указывать на их дисбаланс с процессами апоптоза [5, 11, 15]. Однако изучение процессов пролиферации и апоптоза требует проведения самостоятельных исследований.

Учитывая, что подсадка самцов осуществлялась на 10-е сутки после введения препарата самкам (в этот период в крови самок D-галактозамин отсутствует), мы склонны полагать, что наблюдаемые нами изменения являются следствием поражения печени самки крысы, а не прямого воздействия гепатотропного яда на плод.

Таким образом, можно сделать выводы, что у потомства матерей с экспериментальным D-галактозаминовым поражением печени нарушается качественный и количественный состав эпителия крипт слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аруин Л. И., Капуллер Л. Л. и Исаков В. А. Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника. М., Трида-Х, 1998.
2. Бояков А. А. Характер становления гастроассоциированной лимфоидной системы слизистой оболочки кишечника у потомства животных с хроническим поражением печени: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Челябинск, 2001.
3. Ильных М. А. и Брюхин Г. В. Структурно-функциональное становление поджелудочной железы потомства животных с хроническим экспериментальным поражением гепатобилиарной системы различного генеза. Вестн. Челябинск. гос. педагогическ. ун-та, 2006, ч. 4, № 6, с. 113–123.
4. Райхлин Н. Т., Южаков В. В., Кветной И. М. и др. Современные методы изучения функциональной морфологии эндокринных клеток. Арх. пат., 1996, т. 58, № 2, с. 21–28.
5. Савченков Ю. И. и Лобынцев К. С. Очерки физиологии и морфологии функциональной системы мать—плод. М., Медицина, 1980.

6. Смекалина О. Ю. и Брюхин Г. В. Морфофункциональная характеристика эндокринных и тучных клеток слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки потомства самок крыс с хроническим экспериментальным поражением печени. Вестн. Южно-Уральского гос. ун-та. Серия образование, здравоохранение, физическая культура, 2011, вып. 26, № 7 (224), с. 120–124.
7. Сугрובה Н. П., Медведник Р. С., Ефимова Л. В. и др. Влияние убихинона-10 на развитие D-галактозаминового гепатита у крыс. Бюл. exper. биол., 1992, т. 115, № 11, с. 504–506.
8. Gerike T. G., Paulus U., Potten C. S. and Loeffler M. A dynamic model of proliferation and differentiation in the intestinal crypt based on a hypothetical intraepithelial growth factor. Cell Prolif., 1998, v. 31, № 2, p. 93–110.
9. Horn P. J. and Peterson C. L. Heterochromatin assembly: A new twist on an old model. Chrom. Res., 2006, v. 14, p. 83–94.
10. Kraehenbuhl J. P., Pringault E. and Neutra M. R. Intestinal epithelia and barrier functions. Aliment. Pharmacol. Ther., 1997, v. 11, Suppl. 3, p. 3–9.
11. Mc Cole D. F. and Barrett K. E. Varied role of the gut epithelium in mucosal homeostasis. Curr. Opin. Gastroenterol., 2007, v. 23, № 6, p. 647–654.
12. Mc Kay D. M. and Perdue M. H. Intestinal epithelial function: the case for immunophysiological regulation. Digest. Dis. Sci., 1993, v. 38, № 8, p. 1377–1388.
13. Reinacher-Schic A., Petrasch S. and Burger A. Helicobacter pylori induces apoptosis in mucosal lymphocytes in patients with gastritis. Z. Gastroenterol., 1998, Bd. 36, S. 1021–1026.
14. Watson A. J., Duckworth C. A., Guan Y. and Montrose M. H. Mechanisms of epithelial cell shedding in the Mammalian intestine and maintenance of barrier function. Ann. N. Y. Acad. Sci., 2009, v. 1165, p. 135–142.
15. Yamaguchi T., Nakajima N., Kuwayama H. et al. Gastric epithelial cell proliferation and apoptosis in Helicobacter pylori-infected mice. Aliment. Pharmacol. Ther., 2000, v. 14 (suppl. 1), p. 68–73.
16. Yue W-f, Zhou F., Malik F. A. et al Demonstration of protein absorption in the intestinal epithelium of fish and mice by laser scanning confocal microscopy. Biol. Chem., 2010, v. 391, p. 1197–1203.

Поступила в редакцию 13.12.2012
Получена после доработки 27.06.2013

MORPHO-FUNCTIONAL CHARACTERISTIC OF THE DUODENAL CRYPT EPITHELIUM IN THE OFFSPRING OF FEMALE RATS WITH EXPERIMENTAL LIVER INJURY

O. Yu. Serysheva and G. V. Briukhin

The quantitative characteristics and qualitative composition of the crypt epithelium of the duodenal mucosa was studied in 90 Wistar rats aged 1–60 days which were born to females with experimental D-galactosamine-induced liver injury. Histological sections were stained with hematoxylin–eosin, toluidine blue to demonstrate the goblet cells and impregnated with silver nitrate to identify the endocrine cells. The linear dimensions of the intestinal crypts (height and width of the crypts in their longitudinal sections) were determined. The total number of epithelial cells, microvillous enterocytes, endocrine goblet cells, and intraepithelial lymphocytes were counted per longitudinal section through the crypt. Linear dimensions of microvillous enterocytes (height, width), and the volume of their nuclei were calculated. In experimental animals, as compared to the control ones (the offspring of intact mothers; n=90), the linear dimensions of the crypts were unchanged. These animals had the increased number of the microvillous enterocytes, goblet and endocrine cells along with the decreased dimensions of the the microvillous enterocytes and their nuclear volume. At the same time, these animals demonstrated an increase in the nuclear hyperchromism of the epithelial cells and the increment of the intraepithelial lymphocyte numbers.

Key words: *duodenum, crypt, epithelium, liver injury*

Department of Histology, Embryology and Cytology, Chelyabinsk State Medical Academy