

© Л.М. Яковлева, Л.А. Любовцева, 2012
УДК 611.344:616-099.599.323.4

Л.М. Яковлева и Л.А. Любовцева

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПОДВЗДОШНОЙ КИШКИ КРЫС ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ ЭТАНОЛОМ

Кафедра общей и клинической патологии с курсом судебной медицины (зав. — проф. Л.Н. Иванов); кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. — проф. Л.А. Любовцева), Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова, г. Чебоксары, e-mail: 28Lybov@mail.ru

На крысах-самцах (n=36) с использованием гистологических, морфометрических и гистохимических методов изучено влияние на морфофункциональное состояние подвздошной кишки хронической алкогольной интоксикации продолжительностью 2, 4 и 6 мес. Исследование показало, что алкоголизация сроком 2 мес приводит к изменению слизистой оболочки подвздошной кишки, выражающемуся в ее гипертрофии на фоне повышения митотической активности эпителиоцитов и числа бокаловидных клеток. Повышается активность сукцинатдегидрогеназы в энтероцитах и миоцитах мышечной оболочки стенки подвздошной кишки. Через 4 и 6 мес изменения проявляются угнетением митотической активности энтероцитов. К 6-му месяцу эксперимента наблюдается отчетливо выраженная атрофия слизистой оболочки. Активность сукцинатдегидрогеназы снижается во всех исследованных структурах.

Ключевые слова: подвздошная кишка, слизистая оболочка, мышечная оболочка, сукцинатдегидрогеназа, алкоголь

Клинические и экспериментальные исследования, связанные с изучением действия алкоголя на структуры пищеварительного тракта, в большинстве случаев направлены на выявление изменений проксимального отдела пищеварительного канала. Наиболее изученными являются желудок и двенадцатиперстная кишка [6, 10, 14], где начинается простая диффузия этанола через апикальную поверхность эпителиоцитов. Однако, как известно, большая часть введенного алкоголя (80%) постепенно поступает в тонкую кишку, где происходит его всасывание: 9% — в двенадцатиперстной кишке, 53% — в тощей, 18% — в подвздошной кишке [9].

В литературе имеются данные об изменениях эпителия слизистой оболочки кишечника в условиях алкогольной интоксикации [1, 13, 20, 24], которые используются для диагностики и лечения энтеральной недостаточности. В клиническом аспекте проблема диагностики морфофункционального состояния подвздошной кишки остается недостаточно разработанной [18]. В литературе отсутствует детальное описание морфофункционального состояния подвздошной кишки при хронической алкогольной интоксикации. Поэтому целью данного исследования явилось изучение морфофункциональных изменений слизистой оболочки подвздошной кишки крыс в различные сроки хронической алкогольной интоксикации.

Материал и методы. Исследование проведено на белых беспородных крысах-самцах массой 170–200 г, которые были разделены на 2 группы: контрольную — интактные животные (n=12) и подопытную (n=36). Крысы подопытной группы в качестве единственного источника питья получали

20% раствор этилового спирта в течение 2, 4 и 6 мес (в каждую временную группу входили по 12 животных). Все действия, предусматривавшие контакт с лабораторными животными, осуществляли с учетом «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР) и Федерального Закона РФ «О защите животных от жестокого обращения» от 01.01.1997 г. Крыс декапитировали, вырезали участок тонкой кишки на расстоянии 2 см от подвздошно-кишечного отверстия, фиксировали в 10% нейтральном формалине и заливали в парафин по стандартной методике. Гистологические поперечные срезы толщиной 15 мкм окрашивали гематоксилином–эозином. Препараты изучали с помощью микроскопа Биомед-1 (ЛОМО, Россия). В полученных препаратах при об. 40, ок. 10 с помощью программы Sigma Scan Pro измеряли: высоту ворсинок, глубину крипт, определяли продольный размер энтероцитов. Подсчет числа энтероцитов и бокаловидных клеток проводили визуально при об. 40, ок. 10 в 10 ворсинках и крипах на 5 срезах у каждого животного. Кроме того, при иммерсионном увеличении в крипах подсчитывали фигуры митозов.

В свежеприготовленных криостатных срезах толщиной 10 мкм тетразолиевым методом по Лойда [7] определяли активность окислительно-восстановительного фермента сукцинатдегидрогеназы (СДГ). Цитофотометрию проводили с помощью микроскопа Микромед-2 (ЛОМО, Россия) при об. 40, ок. 10, диаметре зонда 0,5 мм с использованием фотоэлектронасадки ФМЭЛ-1 с ФЭУ-79 (ЛОМО, Россия). Для получения монохроматического пучка света использовали интерференционный светофильтр с максимумом светопропускания ($\lambda_{\text{max}}=620$ нм). Регистрацию светопропускания осуществляли с помощью цифрового вольтметра, выражая результат в относительных единицах оптической плотности (отн. ед.).

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью персонального компьютера с использованием стандартного пакета программ. Различия оценивали по t-критерию Стьюдента и считали значимыми при $P<0,05$.

Результаты исследования. Примикроскопическом исследовании стенки подвздошной кишки ее гистоархитектоника сохранялась во все сроки алкогольной интоксикации. Однако у подопытных крыс через 2 мес употребления алкоголя произошло увеличение высоты ворсинок до 116% и глубины крипт до 121%. В эпителии ворсинок увеличилось число бокаловидных клеток (до 129%) и продольный размер энтероцитов (до 109%).

На поперечном срезе крипт число энтероцитов увеличилось до 115%, а бокаловидных клеток — до 125%. В эпителии крипт наблюдалось увеличение числа митотически делящихся клеток (таблица).

При цитофотометрии энтероцитов определялось увеличение активности СДГ. В энтероцитах, расположенных на вершине ворсинок, его активность была выше, чем в клетках, находящихся у их основания, соответственно 148 и 143%.

В миоцитах наружного слоя мышечной оболочки к этому сроку активность фермента также была повышена до 169% (см. таблицу).

После продолжительной алкогольной интоксикации сроком 4 мес отмечено истончение слизистой оболочки за счет уменьшения высоты ворсинок и глубины крипт соответственно до 96 и 90% значений в контроле. В эпителии крипт частота выявления фигур митоза была снижена до 85%, однако число бокаловидных клеток оставалось увеличенным до 116%. В области ворсинок снижается численность энтероцитов и уве-

личивается число бокаловидных клеток до 138%. Наблюдается снижение активности СДГ, причем в энтероцитах, расположенных у основания ворсинок, ее активность уменьшалась быстрее — до 78%, чем на их вершине, где сохранялось незначительное ее преобладание по сравнению с контролем — 116% (рисунок).

В миоцитах продольного слоя мышечной оболочки кишки активность СДГ оставалась практически на том же уровне, что и в начальной стадии алкоголизации — 161% (см. таблицу).

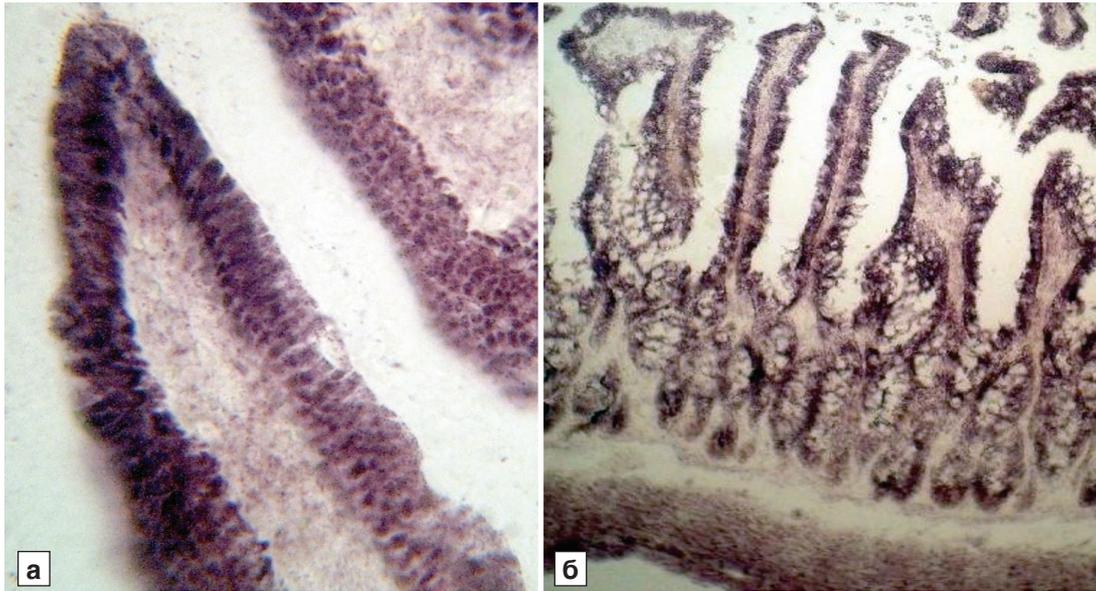
На 180-е сутки хронической алкогольной интоксикации описанные структурные изменения в слизистой оболочке нарастали. Наблюдалось искривление ворсинок, уменьшение толщины собственной пластинки слизистой оболочки и снижение числа энтероцитов до 94%. Однако число бокаловидных клеток в ворсинках оставалось повышенным по сравнению с контролем. Высота ворсинок снижалась до 84%. Отмечалось уменьшение глубины крипт до 81%, сохранялась тенденция к снижению числа энтероцитов (94%). Число митотически делящихся клеток в криптах снижалось до 83%. Повышенное содержание бокаловидных клеток сохранялось (106%). Визуально отмечалось увеличение размеров бокаловидных клеток, они выбухали над слоем эпителия и становились искривленными. Во всех исследуемых структурах подвздошной кишки продолжалось ингибирование ферментативной активности СДГ.

Характеристика изменений в подвздошной кишке крыс в различные сроки алкогольной интоксикации ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Исследованные структуры	Показатель	Интактные животные (контроль)	Срок от начала опыта (мес)			
			2	4	6	
Ворсинки	Число энтероцитов	119±6	129±6	117±6	112±9	
	Высота энтероцита, мкм	21,3±0,6	25,7±1,0***	22,5±0,7*	22,1±0,6**	
	Доля бокаловидных экзокриноцитов, %	15,1±0,9	19,5±1,0**	20,9±1,5**	20,8±1,8***	
	Высота ворсинок, мкм	328±11	381±9***	316±10***	275±10*	
	Активность СДГ в энтероцитах, отн. ед.:	на вершине ворсинки	0,321±0,020	0,40±0,04***	0,36±0,13*	0,29±0,03
		у основании ворсинки	0,230±0,021	0,33±0,04*	0,180±0,012	0,190±0,009
Крипты	Число энтероцитов	19,8±0,8	22,8±1,2*	19,4±0,7	18,7±0,6	
	Высота энтероцита, мкм	20,4±0,5	21,6±0,8	22,8±0,6***	22,2±0,9	
	Доля митотически делящихся клеток, %	15,7±0,9	18,6±0,8*	13,4±0,7*	13,1±0,5**	
	Доля бокаловидных экзокриноцитов, %	18,5±1,3	23,1±0,8	21,6±0,7**	19,6±0,9	
	Глубина крипт, мкм	228±9	225±4**	204±7*	183±7***	
	Активность СДГ в клетках мышечной оболочки, отн. ед.	0,131±0,020	0,22±0,03*	0,210±0,020*	0,120±0,025	

Примечание. СДГ — сукцинатдегидрогеназа.

Различия значимы по сравнению с показателями в контрольной группе животных при: * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001.



Подвздошная кишка крысы.

а — активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) в эпителии ворсинки у контрольного (интактного) животного; б — активность СДГ в стенке кишки крысы после 6-месячной алкогольной интоксикации. Окраска по Лойду. Ув.: а — 400; б — 100.

Обсуждение полученных данных. Этанол для пищеварительного тракта является местным повреждающим фактором, способным вызвать в нем деструктивные изменения [8, 19]. Однако его слизистая оболочка обладает мощными защитными свойствами и способна активно обновляться в результате повреждения, при котором подключаются механизмы, направленные на поддержание структурной целостности ее тканей [2]. Этанол, имеющий слабую поляризацию и небольшие размеры молекул, легко проникает в клеточную мембрану, изменяя микросвязь и упорядоченность липидно-гидрофобного бислоя [25]. Между тем, при алкогольной интоксикации причиной повреждения мембран митохондрий эндоплазматической сети могут быть также ацетальдегид (АЦД) [16] и избыточное образование активных форм кислорода [3, 21, 22]. В любом случае возникающие изменения в клетках во многом зависят от концентрации и длительности приема алкоголя. В проведенных исследованиях мы наблюдали изменения в слизистой оболочке подвздошной кишки через 2 мес после начала алкоголизации крыс 20% раствором этанола. В частности, в криптах происходило повышение митотической активности и усиление пролиферации эпителиоцитов и их дифференцировки, о чем свидетельствует увеличение числа бокаловидных экзокриноцитов. Морфологические изменения в кишке сочетаются с повышением активности митохондриального фермента СДГ. Вероятно, активация фермента является компенсаторной

реакцией клеток на содержание АЦД, образующегося в большом количестве не только цитозольной алкогольдегидрогеназой, но и микросомальной этанол-окисляющей системой и каталазным путем окисления [12, 23]. Известно, что повышенное содержание АЦД способно стимулировать окислительно-восстановительные процессы в митохондриях [4, 15, 17]. Вероятно, в начале алкогольной интоксикации на фоне высокой компенсаторной способности в наиболее функционально активных структурах кишечника (сокращающихся клетках мышечной оболочки, энтероцитах, расположенных на ворсинках) активность СДГ увеличивается.

В то же время, при длительной алкогольной интоксикации в организме накапливаются реакционные продукты метаболизма, которые являются ингибиторами ключевого фермента цикла Кребса — СДГ [5, 11]. Результаты, полученные нами при алкогольной интоксикации на протяжении 4 и 6 мес, показывают, что в энтероцитах подвздошной кишки возникают отчетливо выраженные морфофункциональные изменения. Количественное гистохимическое исследование установило значительное снижение активности СДГ во всасывающих клетках кишки и клетках мышечной оболочки. Наблюдаемые изменения согласуются с данными о прямом ингибирующем воздействии этанола на СДГ [11]. Возникающий метаболический сдвиг сопровождается нарушением промежуточного обмена, в частности, снижением анаболических процессов [17]. На фоне

длительной алкогольной интоксикации атрофические изменения в слизистой оболочке подвздошной кишки нарастают; вероятно, это связано со снижением регенераторной способности энтероцитов. Угнетение митотической активности проявляется уменьшением высоты ворсинок и глубины крипт. Данные изменения нарастают к 6-му месяцу алкоголизации.

Таким образом, полученные результаты показывают, что хроническая этаноловая интоксикация приводит к морфофункциональным изменениям слизистой оболочки подвздошной кишки. Выраженность изменений зависит от длительности алкоголизации. Защитно-компенсаторные реакции, которые подключаются с момента начала употребления алкоголя, способствуют увеличению активности регенераторных процессов с повышенным слизеобразованием и развитием гипертрофии слизистой оболочки кишки.

При длительной алкоголизации, когда адаптационные механизмы в условиях патологии становятся недостаточными для обеспечения компенсации и ликвидации повреждающего действия этанола в подвздошной кишке, снижается пролиферативная активность энтероцитов, что приводит к гипотрофии и деструкции эпителиального слоя.

ЛИТЕРАТУРА

- Бегалиева А.М. и Федорова Н.Н. Изменение эпителия слизистой оболочки кишечника белых мышей под влиянием этанола. Вестн. Астраханск. гос. тех. ун-та, серия естеств. науки, 2010, № 1, с. 61–62.
- Быков В.Л. и Леонтьева И.В. Повреждение и репаративная регенерация эпителия слизистой оболочки полости рта при воздействии цитостатиков (тканевые, клеточные и молекулярные механизмы). Морфология, 2011, т. 139, вып. 2, с. 7–17.
- Зиматкин С.М. Роль ацетальдегида в патогенезе алкоголизма. Наркология, 2007, № 12, с. 91–103.
- Кондрашова М.Н., Ахмеров Р.Н. и Акоев И.Г. Митохондрии. М., Наука, 1974.
- Лапин А.А. Гистохимическая характеристика алкогольного поражения сердца в эксперименте. В кн.: Материалы Всерос. науч.-практ. конф. «Молодые ученые в медицине», посвящ. 1000-летию Казани и 60-летию Победы в Великой Отечественной войне. Казань, Изд-во ТАТмедиа, 2005, с. 225.
- Лебедев С.П. Морфология и патогенез висцеральных проявлений хронического алкоголизма. Арх. пат., 1982, т. 44, № 5, с. 80–86.
- Лойда З., Госсрау Р. и Шиблер Т. Гистохимия ферментов. Лабораторные методы. М., Мир, 1982.
- Маколкин В.И. и Махов В.М. Поражение желудочно-кишечного тракта при алкоголизме (зависимость от длительности и стадии). В кн.: Реферативный сборник «Новости науки и техники». Серия «Медицина». Вып. «Алкогольная болезнь», 1997, № 12, с. 1–4.
- Митина Л.В. и Хохлов А.Л. Оценка эффективности карбамазепина и вальпроевой кислоты при алкогольном постинтоксикационном синдроме по кинетике этанола и ацетальдегида и содержанию биогенных моноаминов. Фармакол. и токсикол., 1991, № 5, с. 60–62.
- Нагорный В.Л. Поражения гастродуоденальной системы при алкогольной болезни у мужчин молодого возраста: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Уфа, 2006.
- Петрова З.В., Коршунов Д.А., Слепичев В.А. и др. Состояние системы энергопродукции печени и головного мозга крыс при острой и хронической интоксикации этанолом. Бюл. экспер. биол., т. 149, 2010, № 2, с. 169–173.
- Пиголкин Ю.И. Алкогольоксиляющие ферменты и динамика содержания этанола при острой алкогольной интоксикации. Морфология, 2006, т. 129, вып. 2, с. 76–77.
- Пулева Г.Н., Крутилова А.А. и Сентюрлова Л.Г. Морфофункциональная характеристика тонкой кишки в условиях экспериментальной алкогольной интоксикации. Морфология, 2009, т. 136, вып. 4, с. 118–119.
- Разводовский Ю.Е. Алкоголь и смертность от язвенной болезни желудка. Вопр. наркологии, 2004, № 3, с. 57–62.
- Рослый И.М., Абрамов С.В., Агаронов В.Р. и др. Биохимия и алкоголизм (I): Метаболические процессы при алкоголизме. Вопр. наркологии, 2004, № 2, с. 70–79.
- Сафонова О.А., Рахманова Т.И., Попова Т.Н. и Панченко Л.Ф. Влияние цитрата на активность антиоксидантных ферментов в тканях крыс при хронической алкогольной интоксикации. Наркология, 2008, № 9, с. 53–56.
- Северин Е.С. Биохимия. М., ГЭОТАР-Медиа, 2005.
- Филимонов Р.М. Гастродуоденальная патология и проблемы восстановительного лечения. М., Медицинское информационное агентство, 2005.
- Шептулин А. А. Алкогольные поражения слизистой оболочки желудка. Рос. журн. гастроэнтерол., гематол., колопроктол., 2008, № 5, с. 62–64.
- Яковлева Л.М. и Кроткова О.С. Морфологические изменения слизистой оболочки тонкого кишечника у экспериментальных крыс при хронической алкогольной интоксикации. Вестн. Российск. ун-та дружбы народов. Серия «Медицина», 2009, № 4, с. 313–314.
- Cederbaum A.I. Microsomal generation of reactive oxygen species and their possible in alcohol hepatotoxicity. Alcohol., Suppl. 1991, v. 1, № 6, p. 291–296.
- Gutierrez-Ruiz M. and Gomez-Quiroz L.E. Liver fibrosis: searching for cell model answers. Liver Int., 2007, v. 27, № 4, p. 434–439.
- Lieber C. S. Biochemical and molecular basis of alcohol-induced injury to liver and other tissues. J. Med., 1989, v. 319, № 25, p. 1639–1650.
- Tang Y., Forsyth C.B., Banan A. et al. Oats supplementation prevents alcohol-induced gut leakiness in rats by preventing alcohol-induced oxidative tissue damage. J. Pharmacol. Exp. Ther., 2009, v. 329, № 3, p. 952–958.
- Yurtas L. Dale B. and Klemm W. Alcohol intoxicates humans by disrupting cell function. Addict. Letter, 1991, v. 7, № 10, p. 5.

Поступила в редакцию 27.11.2011
Получена после доработки 17.12.2011

MORPHO-FUNCTIONAL CHANGES OF RAT ILEUM IN ETHANOL INTOXICATION

L.M. Yakovleva and L.A. Liubovtseva

The effect of chronic alcohol intoxication of 2, 4 and 6 months' duration on the morpho-functional state of the ileum was studied in male rats (n=36) using histological, morphometric and histochemical methods. The results show that alcohol intoxication for a period of 2 months induced the changes in the mucous membrane of the ileum which in the form of its hypertrophy accompanied by the increase of epitheliocyte mitotic activity and goblet cell number. The activity of succinate dehydrogenase

in the enterocytes and muscular tunic myocytes of the ileum wall was increased. After 4 and 6 months the changes included the inhibition of enterocyte mitotic activity. By 6 months of the experiment marked atrophy of the mucous membrane was noted. Succinate dehydrogenase activity was decreased in all the structures studied.

Key words: *ileum, mucous membrane, muscular tunic, succinate dehydrogenase, alcohol*

Department of General and Clinical Pathology with a Course of Forensic Medicine, Department of Histology, Cytology and Embryology, I.N. Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary

© Коллектив авторов, 2012
УДК 616.231-089.844

М.В. Киселевский¹, Н.Ю. Анисимова¹, О.В. Лебединская³, Б.Е. Полоцкий² и М.И. Давыдов²

ГЕТЕРОТОПНАЯ ТРАНСПЛАНТАЦИЯ НЕИММУНОГЕННОЙ ТРАХЕИ, ЗАСЕЛЁННОЙ КОСТНОМОЗГОВЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ РЕЦИПИЕНТА

¹ Лаборатория клеточного иммунитета (зав. — проф. М.В. Киселевский), ² торакоабдоминальное отделение (зав. — академик РАН и РАМН проф. М.И. Давыдов), Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва; ³ кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии (зав. — проф. В.А. Четвертных), Пермская государственная медицинская академия им. акад. Е.А. Вагнера, e-mail: lebedinska@mail.ru

На 30 мышах линий C57BL/6 и Balb/c массой 22–25 г изучены морфологические изменения в лишённой клеток аллогенной трахее при заселении костномозговыми стромальными (мезенхимальными) стволовыми клетками (КССК) реципиента и её гетеротопной трансплантации. Результаты исследования показали недостаточную эффективность режима подготовки трансплантата методом замораживания и размораживания, поскольку в этом случае развивалась воспалительная реакция в области аллотрансплантата и происходило его отторжение. Установлено, что предложенный авторами режим получения лишённого клеток трансплантата трахеи путём обработки перхлоратом натрия (NaClO_4), в отличие от режима замораживания и размораживания, позволяет эффективно удалять клетки, экспрессирующие маркеры МНС I и МНС II. Воздействие NaClO_4 не приводит ни к повреждению хондроцитов, ни к существенным нарушениям структуры хряща трахеи в гетеротопных трансплантатах. Поскольку заселение трансплантата КССК способствует восстановлению соединительной ткани, снижает образование грануляций в области анастомоза и способствует более быстрой эпителизации трансплантата, то наиболее перспективным для подготовки трахеи к пересадке является сочетание удаления иммунокомпетентных клеток из органа NaClO_4 с последующим заселением полученного трансплантата КССК.

Ключевые слова: *трахея, аллотрансплантация, гетеротопная трансплантация, костномозговые стромальные (мезенхимальные) стволовые клетки*

Несмотря на несомненные успехи в развитии трансплантологии, пересадка трахеи остаётся нерешённой и одной из важных проблем в торакальной хирургии. Многочисленные экспериментальные и клинические исследования показали, что основной причиной отторжения трахеи, как и других органов после трансплантации, является

реакция иммунной системы реципиента на антигены главного комплекса гистосовместимости донора (МНС I и МНС II) с индукцией аллореактивных CD4^+ Т-лимфоцитов по отношению к этим антигенам [4, 11]. Важную роль в отторжении аллотрансплантата играют также донорские антигенпредставляющие клетки [3]. Иммунодепрессанты,