
Вопросы общей патологии

УДК 576.7

DOI 10.52246/1606-8157_2024_29_2_39

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ ЭНТЕРОЦИТА КИШЕЧНОЙ ВОРСИНКИ У КРЫС В ПЕРВЫЕ СУТКИ ПОСЛЕ РОЖДЕНИЯ

И. С. Сесорова¹, доктор биологических наук,

А. В. Зайцева², zaytseva2312@inbox.ru,

П. С. Вавилов¹, vavilov-007@mail.ru,

Т. Е. Казакова¹, кандидат биологических наук, ttattyana@list.ru

¹ ФГБОУ ВО «Ивановский государственный медицинский университет» Минздрава России, Иваново, 153012, Россия, г. Иваново, Шереметевский просп., д. 8

² ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, 197341, Россия, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2

РЕЗЮМЕ Несмотря на широкое распространение искусственного питания новорожденных, детального понимания функциональных особенностей строения кишечной ворсинки в первые сутки после рождения в настоящее время недостаточно.

Цель – изучить функциональные особенности ультраструктуры энтероцита кишечной ворсинки новорожденных крыс до начала кормления и транспортный путь липидов через энтероцит после первого кормления.

Материал и методы. Изучался начальный отдел тонкой кишки крыс линии Wistar в первые сутки после рождения: через 30–40 минут после рождения до начала сосания и после кормления крысят. Методами трансмиссионной электронной микроскопии и электронно-микроскопической томографии проанализированы структуры секреторного и эндоцитозного путей энтероцита кишечной ворсинки.

Результаты и обсуждение. В энтероцитах новорожденных крыс обнаружен апикальный эндоцитоз и хорошо развитая апикальная тубулярно-везикулярная эндосомальная сеть. Получены морфологические доказательства транспорта липидов по секреторному пути у новорожденных крыс до начала кормления, о чем свидетельствует функционально активный комплекс Гольджи (КГ). В первые сутки после рождения липиды в кишечной ворсинке у новорожденных крыс транспортируются эндоцитозом и наблюдается состояние перегрузки секреторного пути на участке ЭР-КГ. Это приводит к скоплению липидных капель в цитоплазме энтероцита и их слиянию в части клеток с образованием гигантских липидных «озер». Специфические изменения в энтероцитах новорожденных крыс после первого кормления аналогичны описанным ранее у половозрелых крыс после большой липидной нагрузки.

Заключение. Начало кормления у новорожденных крыс вызывает в кишечной ворсинке ситуацию избыточной липидной нагрузки и накопление в цитоплазме энтероцитов гигантских липидных капель, что может привести к коллапсу транспортного пути и прекращению абсорбционной функции эпителия.

Ключевые слова: кишечная ворсинка, энтероциты, новорожденный, перегрузка липидами, транцитоз, комплекс Гольджи.

FUNCTIONAL FEATURES OF ENTEROCYTE ULTRASTRUCTURE OF INTESTINAL VILLI IN RATS IN THE FIRST DAY AFTER BIRTH

I. S. Sesorova, A. V. Zaitseva, P. S Vavilov, T. E. Kazarova

ABSTRACT. Despite the widespread use of artificial nutrition in neonates, a detailed understanding of the functional features of the intestinal villi structure in the first day after birth is currently insufficient.

Objective – to study the functional features of the enterocyte ultrastructure of the intestinal villi of newborn rats before the beginning of feeding and the transport pathway of lipids through the enterocyte after the first feeding.

Material and methods. The initial section of the small intestine of Wistar rats was studied on the first day after birth: 30–40 minutes after birth before suckling and after feeding. The structures of secretory and endocytosis pathways of enterocyte of intestinal villi were analysed by transmission electron microscopy and electron microscopic tomography.

Results and discussion. Apical endocytosis and a well-developed apical tubular-vesicular endosomal network were found in enterocytes of newborn rats. Morphological evidence of lipid transport via the secretory pathway in newborn rats prior to feeding was obtained, as evidenced by a functionally active Golgi complex (CG). During the first day after birth, lipids in the intestinal villi of newborn rats are transported by endocytosis and a state of overload of the secretory pathway at the ER-Golgi complex site is observed. This leads to the accumulation of lipid droplets in the cytoplasm of the enterocyte and their fusion in part of the cells with the formation of giant lipid "lakes". Specific changes in enterocytes of newborn rats after the first feeding are similar to those described earlier in sexually mature rats after a large lipid load. **Conclusion.** The beginning of feeding in newborn rats causes in intestinal villi a situation of excessive lipid load and accumulation of giant lipid droplets in the cytoplasm of enterocytes, which can lead to collapse of the transport pathway and cessation of the absorptive function of the epithelium.

Key words: intestinal villi, enterocytes, newborn, lipid overloading, transcytosis, Golgi complex.

Онтогенетическое развитие кишечного эпителия у млекопитающих представляет собой сложный процесс, который начинается еще до рождения организма. Несмотря на различия у разных животных и человека сроков созревания слизистой кишечника, существуют общие критические периоды онтогенеза, сопровождающиеся глубокими изменениями структуры и транспортной функции эпителия [12]. Одним из таких периодов является рождение и ранний период сосания, сопровождающийся переходом от внутриутробной к внеутробной среде. На этом этапе чрезвычайно важно понимать, насколько пищеварительная система готова к новым условиям. Поэтому к рациону питания новорожденного предъявляются высокие требования. Между тем, несмотря на широкое распространение искусственного питания новорожденных, детального понимания функциональных особенностей строения кишечной ворсинки в первые сутки после рождения недостаточно. В частности, остаются малоизученными клеточные механиз-

мы транспорта липидов через кишечный эпителий. Мы поставили своей целью исследовать функциональные особенности ультраструктуры энтероцита кишечной ворсинки новорожденных крыс до начала кормления и транспортный путь липидов через энтероцит после первого кормления.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на новорожденных крысах линии Wistar. Изучался начальный отдел тонкой кишки в первые сутки после рождения: через 30–40 минут после рождения до начала сосания и после кормления крысят. Сытость детенышей определялась визуально по степени наполнения желудка. В работе с животными использовались «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» (1977, Хельсинская декларация 1975 г. в ее редакции от 2000 г.). Все манипуляции проводились под масочным эфирным наркозом.

Протокол эксперимента одобрен этическим комитетом ФГБОУ ВО ИвГМА Минздрава России № 5 от 05.12.2018. Экспериментальный материал фиксировался 1 %-ным глутаровым альдегидом, образцы постфиксировались 1 час на льду редуцированным осмием (смесью 2 %-ного OsO_4 на и 3 %-ного ферроцианида калия в соотношении 1:1 на 0,2 М в какодилатном буфере, pH 7,4), промывались и инкубировались 5 мин 0,5 %-ным тиокарбогидрозидом при комнатной температуре. После трехкратной промывки образцы вновь обрабатывались 20 мин редуцированным осмием и промывались (протокол OTOTO, Seligman A. M., 1966, в модификации) [14]. Далее проводили дегидратацию материала в спиртах с восходящей концентрацией, ацетоне и заливку в смолу «Эпон-812» с последующей полимеризацией при +60 °С [3]. Анализировались серийные электронные срезы толщиной 70 нм.

Электронная томография была выполнена на основе блоков с материалом, залитым в эпоксидную смолу, из которых изготавливались серийные эпоновые срезы толщиной 150–200 нм. Срезы окрашивались раствором протеина-А, конъюгированного с 10 нм золотом (1:25), с плотностью мечения менее 1–2 гранул/нм². Сетки со срезами фиксировались держателем гониометра микроскопа Tescnai-12 EM с ускоряющим напряжением 120 кВ и облучались пучком электронов без диафрагмы в течение 5 минут. Серийные вертикальные срезы отбирались при увеличении 26 000 с угла от +70° до –70° наклона гониометра через каждый градус при помощи программы AnalySis. Полученные изображения обрабатывались в программе IMOD. Томограммы построены с помощью Г. В. Безнусенко (Институт молекулярной онкологии, г. Милан, Италия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эпителий кишечной ворсинки у новорожденных крыс имеет плохо сформированный комплекс базолатеральных межклеточных соединений, что объясняет более высокую, чем у взрослых животных, проницаемость «незрелого» кишечного эпителия. Пальцевидные контакты представлены неглубокими одиночными инвагинациями, часто не ограниченными с двух сторон десмосомами. Щелевой и промежуточный контакты слабо выявляются на электронограммах (рис. 1а, б). Между тем строение межклеточных

контактов можно рассматривать не как «незрелость» кишечной ворсинки, а как возможность существования через эпителий кишки двух транспортных путей: трансклеточного и параклеточного, имеющих разное значение в онтогенезе и, видимо, способных регулировать проницаемость кишечника.

Существенной отличительной особенностью строения эпителия новорожденных крыс является наличие клатриновых почек на апикальной части плазмолеммы (рис. 1в), которые отсутствуют у половозрелых крыс. Они содержат хлопьевидный материал и, вероятнее всего, участвуют в транспорте иммуноглобулинов [8].

В апикальной части клетки расположена хорошо выраженная тубулярно-везикулярная сеть (рис. 1г), которая исчезает по мере созревания энтероцита. Клатриновые почки отщепляются от апикальной части плазмолеммы, «теряют» покрытие и встраиваются в тубулярно-везикулярную сеть, высвобождая хлопьевидный материал. Описанная тубулярная сеть является частью эндоцитозного клеточного пути у новорожденных, который, как известно, связан с секреторным путем клетки. Последний уже функционирует у крыс перед рождением, что доказывают грузовые молекулы, обнаруженные в структуре КГ и в пост-Гольджи переносчиках.

Мы не можем точно сказать, являются ли осмиофильные частицы в просвете цистерн агранулярного эндоплазматического ретикулюма (ЭР) и цистерн КГ хиломикронами, но существует высокая вероятность, что незрелые хиломикроны на момент рождения уже могут синтезироваться энтероцитом.

Таким образом, селективный неспецифический транцитоз макромолекул (в том числе липидов, видимо, в составе поглощенных клеточных мембран) у крыс начинается в пренатальном периоде онтогенеза и продолжается в первые сутки после рождения. На этот факт указывает хлопьевидный осмиофильный материал в эндосомах энтероцита, переносчиках КГ, интерстиции собственной пластинки кишечной ворсинки.

В первые сутки после рождения и с началом питания новорожденного материнским молоком происходит перестройка клеточных механизмов проницаемости кишечного эпителия. Младенец получает жиры из грудного молока, в основном в виде триацилглицеридов, которые находятся

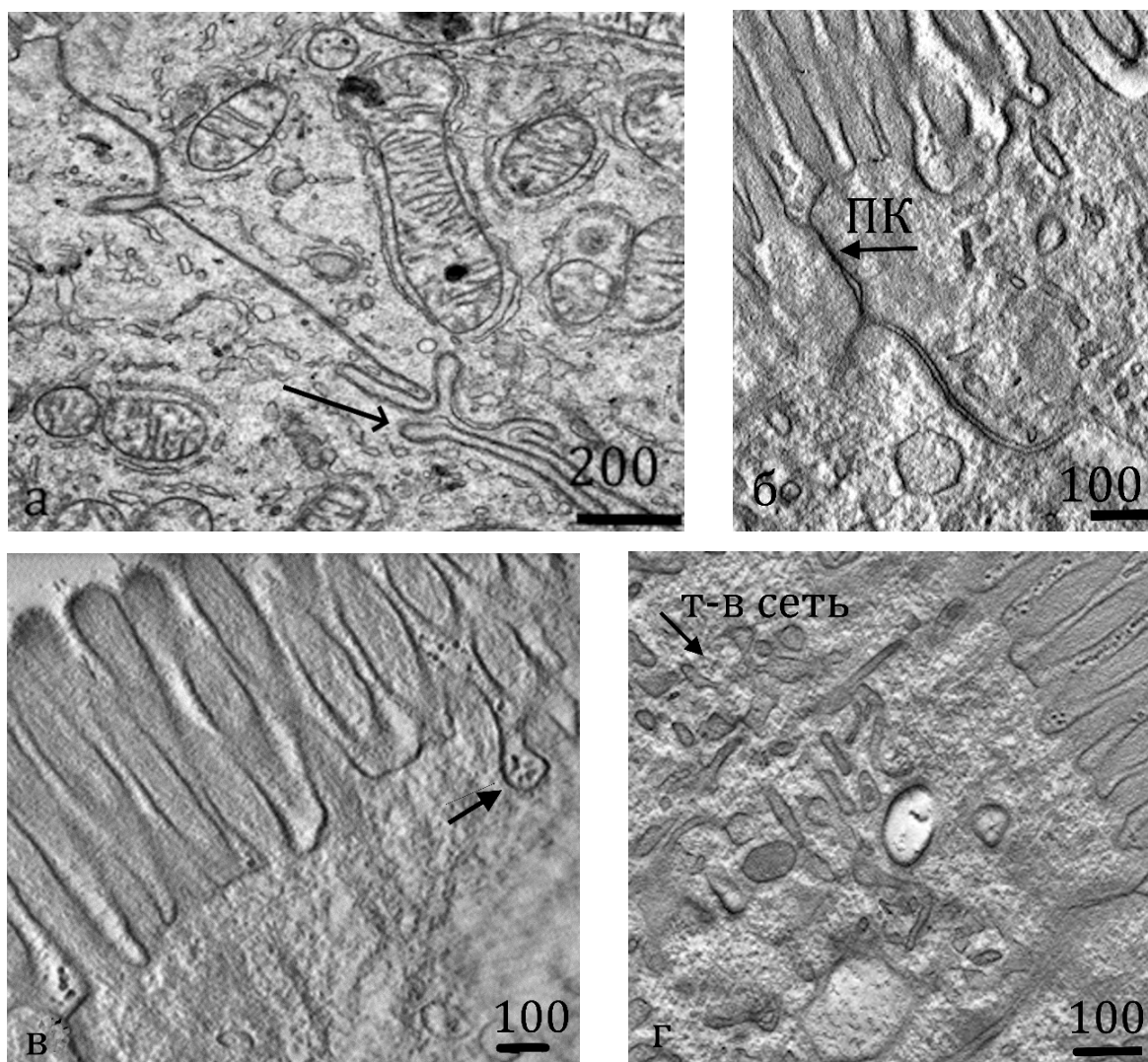


Рис. 1. Энтероцит новорожденной крысы до начала кормления: а, б – межклеточные соединения базолатеральной части плазмолеммы: пальцевидный контакт (↑), плотный контакт (ПК), ТЭМ. Бар 200 нм; в – щеточная каемка, эндосома с хлопьевидным содержимым (↑); г – тубулярно-везикулярное сплетение, ЭМ-томография. Бар 100 нм

в молоке матери в эмульсии в составе мицелл, имеющих фосфолипидную мембрану. Триацилглицериды первоначально расщепляются ферментами, присутствующими в молоке матери [7] и секретирующимися в верхних отделах желудочно-кишечного тракта лингвальными и желудочными липазами. Они могут гидролизовать до 60–70 % потребленных ребенком жиров [7]. В первые дни после рождения желчь еще не секретируется, а секреторная активность ферментов поджелудочной железы у новорожденных низкая. Она повысится только к 10-му дню после рождения [4, 10].

Поэтому после первого кормления липиды попадают в цитоплазму энтероцита по эндосо-

мальному транспортному пути. Мы наблюдаем электронноплотный материал в клатриновых почках, в просвете тубулярно-везикулярной сети. В непосредственной близости от нее находятся поздние эндосомы, имеющие диаметр от 200 до 600 нм, а также многочисленные лизосомы (рис. 2а).

На основании существующих представлений тубулярно-везикулярная сеть может рассматриваться как компартмент для сортировки молекул и определяться как ранняя эндосома [11]. Ранние эндосомы, содержащие грузовые молекулы, созревают, формируя поздние эндосомы, которые сливаются с лизосомами, где и происходит расщепление грузовых молекул ли-

зосомальными гидролазами. После сегрегации лизосомы от эндолизосомы жирные кислоты (вероятнее всего, молекулярными переносчиками) транспортируются из эндосомы на мембраны агранулярной ЭР, где включаются в ресинтез триглицеридов.

У новорожденных крыс после первого кормления в цитоплазме энтероцитов обнаружены липидные капли разных размеров. Проанализировав размеры капель, мы выявили две группы энтероцитов. До 80 % клеток эпителия кишечной ворсинки содержали липидные капли до 400 нм в диаметре. Около 20 % клеток, помимо многочисленных липидных капель разных размеров, имели большие слившиеся липидные «озера» диаметром от 500 до 6000 нм (рис. 2б).

Липидные капли в цитоплазме энтероцитов были описаны в более ранних исследованиях во время абсорбции липидов у крыс, в условиях высокой липидной нагрузки [11], мышей [5], кроликов, свиней [10] и людей [13]. Однако эксперимент, проведенный Т. Казаковой и др. (2018), показал, что в условиях, исключающих избыточную липидную нагрузку на клетки кишечного эпителия, липидных капель в цитоплазме энтероцитов не наблюдается [2]. Мы предполагаем, что скопление липидных капель в цитоплазме энтероцитов новорожденных связано с недостатком (или низкой активностью) белков, участвующих

в формировании хиломикрона (например, апо-липопротеинов) [1]. А это указывает на разную степень морфологической зрелости клеток кишечного эпителия к моменту рождения, обусловленную также ростом кишечной ворсинки. При этом липиды могут всасываться как в более дифференцированные, так и в еще не готовые к транспорту клетки.

Напротив, в секреторном пути энтероцитов кишечной ворсинки мы не обнаружили ни скоплений осмиофильных частиц, ни их слияния. Включения в пост-Гольджи переносчиках могут достигать диаметра около 200 нм. Анализ структуры КГ не выявил достоверных различий с органеллой новорожденных животных до кормления: стопки короткие, в среднем 820 ± 24 нм в диаметре, мало тубулированные (тубулярные структуры занимают $28 \pm 2,5$ % мембран органеллы), свободных везикулярных профилей мало ($8 \pm 0,2$ %) и они не содержат липидных частиц.

Таким образом, в первые сутки после рождения липиды в кишечной ворсинке у новорожденных крыс транспортируются эндоцитозом и наблюдается состояние перегрузки пути на участке ЭР-КГ по причине незрелости энтероцитов кишечной ворсинки. Накопление в цитоплазме энтероцитов гигантских липидных капель может привести к коллапсу транспортного пути и

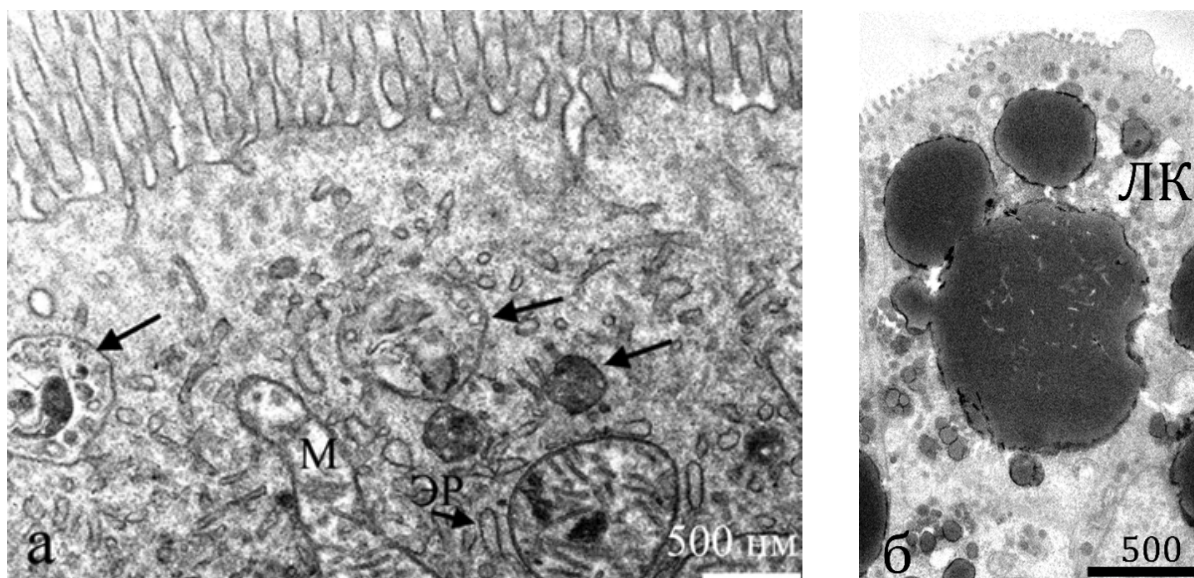


Рис. 2. Энтероцит кишечной ворсинки новорожденной крысы через сутки после рождения (после кормления): а – апикальная часть цитоплазмы: поздняя эндосома – (↑), агранулярный ЭР – (ЭР), ТЭМ. Бар 500 нм.; б – гигантские липидные капли (ЛК), ТЭМ. Бар 500 нм.

прекращению абсорбционной функции эпителия, что проявится в нарушении пищеварения у новорожденных [6]. Напротив, постепенному созреванию слизистой тонкой кишки будет способствовать низкая липидная нагрузка в первые сутки после рождения.

ВЫВОДЫ

1. В энтероцитах новорожденных крыс происходит апикальный эндоцитоз и хорошо развита апикальная тубулярно-везикулярная эндосомальная сеть.
2. Получены морфологические доказательства транспорта липидов по секреторному пути у

новорожденных крыс до начала кормления, о чем свидетельствует функционально активный КГ.

3. Скопление липидных капель в цитоплазме энтероцита новорожденных крыс после первого кормления указывает на «перегрузку» пищевыми липидами секреторного пути клетки на этапе образования прехиломикрона в цистернах агранулярного ЭР. При этом транспортный путь через КГ не испытывает высокой липидной нагрузки. Выявленные структурные изменения в энтероцитах новорожденных крыс аналогичны описанным ранее у половозрелых животных после большой липидной нагрузки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Здорикова М.А., Казакова Т.Е., Димов И. Д., Сесорова И.С. Молекулярные механизмы транспорта липидов из эндоплазматического ретикулума в комплекс Гольджи в энтероците кишечной ворсинки. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2019;11:30-34.
2. Казакова Т.Е., Димов И.Д., Карелина Н.Р., и др. Ультраструктура энтероцита кишечной ворсинки мыши в состоянии относительного функционального покоя. *Вестник новых медицинских технологий*. 2018;25(4):46-50.
3. Миронов А.А., Комиссарчик Я.Ю., Миронов В.А. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине: метод. рук-во. – СПб.; Наука; 1994:400.
4. Cleghorn G, Durie P, Benjamin L, Dati F. The ontogeny of serum immunoreactive pancreatic lipase and cationic trypsinogen in the premature human infant. *Biology of Neonate*. 1988;53:10-16.
5. D Aquila T, Sirohi D, Grabowski JM, et al. Characterization of the proteome of cytoplasmic lipid droplets in mouse enterocytes after a dietary fat challenge. *PLoS ONE* 2015;10:e0126823.
6. D Aquila T, Zembroski AS, Buhman KK. Diet Induced Obesity Alters Intestinal Cytoplasmic Lipid Droplet Morphology and Proteome in the Postprandial Response to Dietary Fat. *Front. Physiol*. 2019;10:180.
7. Dash S, Xiao C, Morgantini C, Lewis GF. New insights into the regulation of chylomicron production. *Annu. Rev. Nutr*. 2015;35:265-294.
8. Kömüves LG, Heath JP. Uptake of maternal immunoglobulins in the enterocytes of suckling piglets: Improved detection with a streptavidin-biotin bridge gold technique. *J. Histochem. Cytochem*. 1992;40:1637-1646.
9. Hamosh M, Scanlon JW, Ganot D, Likel M., et al. Fat digestion in the newborn. Characterization of lipase in gastric aspirates of premature and term infants. *J. of Clinical Investigation*. 1981;67:838-846.
10. Hansen GH, Niels-Christiansen LL, Immerdal L, Danielsen EM. Scavenger receptor class B type I (SR-BI) in pig enterocytes: trafficking from the brush border to lipid droplets during fat absorption. *Gut*. 2003;52:1424-1431.
11. Nikonova MA, Sesorova IS, Dimov ID, Karelina NR, Mironov AA. Effect of the First Feeding on Enterocytes of Newborn Rats. *Int. J. of Molecular Sciences*. 2022;23(22):14179.
12. Pacha J, Balounova K, Sotak M. Circadian regulation of transporter expression and implications for drug disposition. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 2021;17(4):425-439.
13. Robertson MD, Parkes M, Warren BF. Mobilisation of enterocyte fat stores by oral glucose in humans. *Gut*. 2003;52:834-839.
14. Seligman AM. A new staining method (OTO) for enhancing contrast of lipid-containing membranes and droplets in osmium tetroxide-fixed tissue with osmiophilic thiocarbonylhydrazide (TCH). *J. Cell Biol*. 1966;30(2):424-432.