

МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ ТОНКОГО КИШЕЧНИКА ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ УПОТРЕБЛЕНИИ ПИЩЕВОЙ ДОБАВКИ КАРРАГИНАН

Харьковский национальный медицинский университет (г. Харьков)

Результаты, представленные в статье, получены в ходе выполнения НИР «Вивчення віддалених наслідків регулярного споживання харчових продуктів, що містять генетично модифіковані організми, в умовах пошкодження епітеліального бар'єру шлунково-кишкового тракту», № государственной регистрации 0110U000653.

Вступление. В настоящее время участились случаи возникновения хронических воспалительных заболеваний кишечника, к которым относятся болезнь Крона и язвенный колит. Язвенный колит представляет собой хроническое воспалительное заболевание кишечника, которое клинически характеризуется рецидивирующим течением с периодами кровавой диареи и патоморфологически – диффузным воспалительным процессом в стенке толстой кишки [2]. Болезнь Крона – хроническое неспецифическое гранулематозное воспаление желудочно-кишечного тракта, которое может поражать все его отделы, начиная от полости рта и заканчивая прямой кишкой, с преимущественным поражением терминального отрезка подвздошной кишки, характеризующимся вовлечением в патологический процесс всех слоев кишечной стенки с образованием многочисленных язв. Этиология данных заболеваний остается невыясненной, однако предполагается их мультифакториальный генез, включающий комплексное взаимодействие генетических, иммунных факторов и влияния окружающей среды. Одним из потенциальных этиологических факторов хронических воспалительных заболеваний кишечника может служить употребление пищевой добавки Е407, известной как каррагинан, которая используется в пищевой промышленности в качестве загустителя [10]. При этом известно, что с помощью подкожного введения каррагинана моделируют очаговое воспаление, а интраперитонеальное введение приводит к развитию перитонита [3, 7]. В экспериментальной медицине данная пищевая добавка используется также для моделирования воспалительных процессов в желудочно-кишечном тракте [4, 9]. Однако механизмы развития воспаления в стенке кишки при употреблении каррагинана *per os* изучены недостаточно, в частности не исследованы особенности морфологического состояния тонкого кишечника.

Целью исследования явилось изучение морфологического состояния тонкого кишечника и особенностей процессов воспаления и регенерации эпителиоцитов тонкого кишечника при длительном систематическом употреблении пищевой добавки каррагинан.

Объект и методы исследования. Эксперимент проводили на половозрелых крысах-самках линии Вистар, содержащихся в стандартных условиях вивария. Животные были разделены на 2 группы. Первая группа включала в себя крыс, которые употребляли каррагинан в течение 4 недель. Вторая группа являлась контрольной и состояла из интактных животных. Моделирование заболевания осуществлялось путем свободного доступа экспериментальных животных к 1% раствору каррагинана в питьевой воде [4]. Содержание животных и манипуляции над ними проводили в соответствии с положениями Европейской конвенции «О защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

После завершения эксперимента животных выводили из эксперимента с использованием тиопенталового наркоза, извлекали тонкий кишечник. Участки тонкого кишечника (5см выше перехода в толстый кишечник) забирали для морфологического исследования, после фиксации в 10%-ном нейтральном формалине и спиртовой проводки они подвергались парафиновой заливке. Срезы толщиной 5-6 мкм окрашивались гематоксилином-эозином, галлоцианин-хромовыми квасцами по Эйнарсону, пикрофуксином по ван Гизону, ставили ШИК-реакцию. Кроме того, для оценки пролиферативной активности клеток слизистой оболочки использована иммуногистохимическая реакция с мышинными моноклональными антителами к ядерному белку Ki-67 фирмы «Dako» (Дания); визуализация комплекса антиген-антитело проведена путем обработки микропрепаратов раствором кроличьих ФИТЦ-меченых антител фирмы «Dako» (Дания) к IgG мыши. Для оценки степени активации воспалительного процесса поставлена иммуногистохимическая реакция на интерлейкин-1 α (ИЛ-1 α). Использовались мышинные антитела к ИЛ-1 α фирмы «Вектор БЕСТ» (Новосибирск, Российская Федерация) с визуализацией комплекса антиген-антитело

с использованием тетраметилбензидина. Количественная оценка представленности антигена Ki-67 произведена путем определения уровня экспрессии в условных единицах свечения, а ИЛ-1 α – путем определения оптической плотности цитоплазмы ИЛ-1 α -продуцирующих клеток на компьютерных изображениях микропрепаратов.

Микроскопирование и фотографирование препаратов проводили на микроскопах Axiostar-plus (Zeiss) – световое микроскопирование, Axioscope 40 (Zeiss) – люминесцентное микроскопирование. Статистическую обработку данных проводили с помощью пакетов программы GraphPad Prism 5. Для выявления различий между независимыми группами нормально распределенных величин использовали t-критерий Стьюдента-Фишера; различия между группами считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение.

У животных контрольной группы слизистая оболочка приблизительно на 2/3 толщины представлена ворсинками и на 1/3 – железами. Просвет тонкого кишечника узкий. Ворсинки тонкие, эпителий ворсинок хорошо сохранен, но кое-где встречаются участки десквамации эпителия на верхушках ворсин, или отсутствуют единичные эпителиоциты на боковых участках ворсинок. Эпителиоциты имеют призматическую форму. В покровных эпителиоцитах уровень окраски цитоплазмы на нуклеиновые кислоты довольно интенсивный, ядра эухромные.

Среди покровного эпителия много бокаловидных клеток. Секрет большинства бокаловидных клеток пузырьковидный и слабо ШИК-положительный, однако многие бокаловидные клетки при окраске гематоксилином-эозином и постановке ШИК-реакции выглядят пустыми. Эпителиальный слой имеет хорошо выраженную ШИК-положительную тонкую, компактную базальную мембрану. В собственной пластинке слизистой оболочки на уровне ворсин хорошо просматриваются капилляры с тонкой стенкой. В строме ворсинок имеются единичные, тонкие коллагеновые волокна, небольшое количество макрофагов и лимфоцитов. В тонкокишечных железах эпителий сохранен хорошо. Эпителиальные клетки высокие. Ядра эпителия в железах овальные, светлые, с хорошо просматривающимися ядрышками. Между железами в слизистой – тонкие прослойки собственной пластинки с небольшим количеством макрофагов и лимфоцитов.

Микроскопическое исследование гистологических особенностей тонкого кишечника животных основной группы позволило выявить, что прием каррагинана в течение 4 недель приводит к повреждению эпителия слизистой оболочки и развитию хронического воспаления (рис. 1).

Просвет тонкого кишечника расширен, в некоторых случаях – резко расширен. Расширение просвета связано с истончением слизистой. В просвете тонкого кишечника просматриваются частично лизированные обрывки эпителиального пласта, т. е. у животных происходит десквамация эпителия

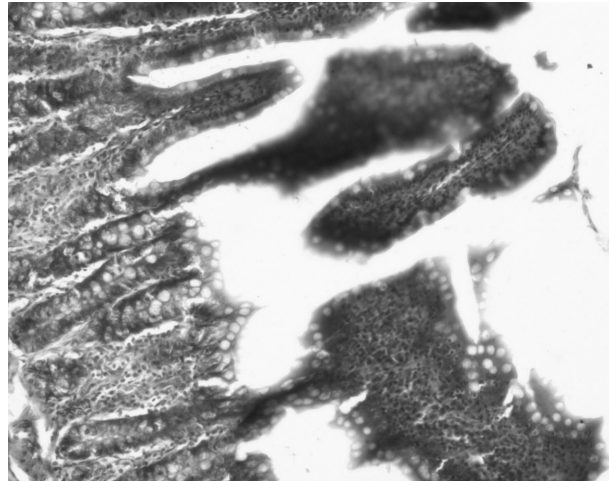


Рис. 1. Слизистая оболочка тонкого кишечника животного основной группы. Деформация ворсин и густая лейкоцитарная инфильтрация собственной пластинки. Окраска гематоксилином-эозином. Ув. 100.

крупными комплексами. Наблюдается уменьшение количества ворсинок слизистой оболочки, некоторые из них широкие, некоторые – узкие, встречаются ворсинки неправильной формы (грибовидные). Имеются участки слизистой оболочки, где ворсинки вообще отсутствуют. Многие ворсинки, особенно верхушечные области, лишены эпителия. На боковых сторонах ворсинок местами наблюдается многорядный эпителий, что свидетельствует о его интенсивной пролиферации. Собственная пластинка слизистой в ворсинке широкая, отечная, густо инфильтрирована круглоядерными лейкоцитами (макрофагами и лимфоцитами). Базальная мембрана эпителия во многих участках в ворсинах отсутствует, местами интерстициальный фуксинофильный коллаген заменил базальную мембрану. Количество бокаловидных клеток среди кишечного эпителия увеличено, они местами интенсивно ШИК-положительны, местами пустые. ШИК-положительный муцин в бокаловидных клетках пенный, жидкий. Тонкокишечные железы в слизистой оболочке тонкой кишки животных основной группы неглубокие. На уровне желез в строме наблюдается увеличенное количество клеточных элементов. На дне тонкокишечных желез, в пролиферативной зоне, просматриваются частые митозы. Количество апоцитозов с объемной прозрачной цитоплазмой – больше, чем в контрольной группе. Кроме того, в средней трети желез при окраске галлоцианином по Эйнарсону обнаруживаются множественные апоптотические тельца. В расширенной собственной пластинке слизистой на уровне желез увеличено количество коллагеновых волокон, которые залегают также и вдоль базальной мембраны эпителия.

В нескольких препаратах обнаружен лимфоцитарный фолликул. Если в контрольной группе он небольшого размера, с густым расположением лимфоцитов, то в основной группе – крупный, но

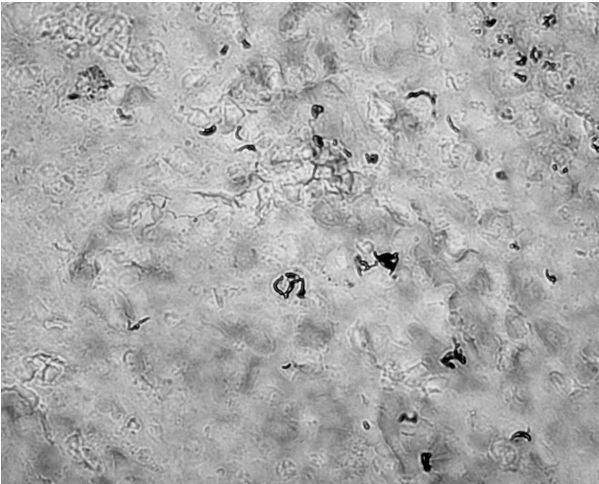


Рис. 2. Слизистая оболочка тонкого кишечника животного основной группы. Высокая экспрессия ИЛ-1α в цитоплазме клеток и значительная диффузная экспрессия. Иммуногистохимическая реакция с антителами к ИЛ-1α. Ув. 400.

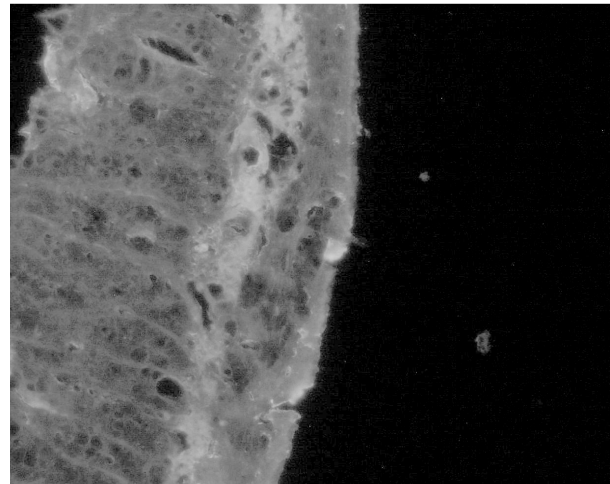


Рис. 3. Слизистая оболочка тонкого кишечника животного основной группы. Высокая экспрессия антигена Ki-67 в полосе, составленной пролиферирующими зонами в кишечных железах. Иммуногистохимическая реакция с антителами к Ki-67. Люминесцентная микроскопия. Ув. 100.

с редко расположенными лимфоцитами. Обнаруженные микроскопические особенности слизистой оболочки тонкой кишки крыс, в течение 28 дней получавших каррагинан *per os*, позволяют диагностировать хронический межзудочный энтерит.

Иммуногистохимическое исследование с использованием антител к ИЛ-1α выявило в ткани тонкого кишечника очень выразительное увеличение не только количества клеток, синтезирующих ИЛ-1α, но и активности этого процесса (рис. 2). Свидетельством последнего является достоверное увеличение оптической плотности цитоплазмы ИЛ-1α-синтезирующих клеток в слизистой тонкого кишечника основной группы по сравнению с контрольной группой (табл.). Кроме того, обратило внимание усиление диффузного окрашивания ткани слизистой у животных основной группы, что мы объяснили возможностью диффузного распределения в ткани синтезированных молекул ИЛ-1α. Подобные изменения указывают на высокую активность воспалительного процесса в стенке тонкого кишечника у животных опытной группы.

Известно, что антигеном, достоверно ассоциированным с фазами клеточного цикла, является Ki-67. Экспрессия этого белка наступает во время пресинтетической фазы, нарастает в течение клеточного цикла и резко уменьшается в фазе митоза

[6]. Экспрессия Ki-67 дает возможность идентифицировать клетки, находящиеся во всех фазах клеточного цикла, кроме фазы покоя [5, 8].

Как указывалось в гистологическом описании, при хроническом воспалительном процессе в слизистой оболочке кишечника, инициированном воздействием каррагинана, наблюдается гибель поверхностного эпителия. Ранее проведенное исследование активности процесса апоптоза в кишечнике путем определения маркеров апоптоза в гомогенате стенки тонкого кишечника и сыворотке крови показало достоверное усиление активности процесса апоптоза при длительном приеме каррагинана [1]. Можно предположить, что ответом на гибель эпителия является усиление его пролиферации в некоторых временных пределах, с последующей истощенностью ресурсов и развитием сначала эрозий, а затем и язв слизистой оболочки. В данном эксперименте животные получали каррагинан в течение 4 недель. Этот срок оказался в пределах пролиферативных ресурсов слизистой, что мы видим по усилению экспрессии антигена Ki-67 в пролиферативной зоне желез тонкого кишечника (табл., рис. 3).

Таким образом, потенциальная роль каррагинана в развитии воспалительного процесса в пищеварительном тракте обуславливает необходимость

Показатели иммуногистохимического исследования

Группы животных	Интенсивность экспрессии Ki-67 (усл. ед. свечения)	Оптическая плотность цитоплазмы ИЛ-1α-синтезирующих клеток, (усл. ед. опт. пл.)
Контрольная (n=10)	0,59±0,02	0,17±0,01
Каррагинан 28 дней (n=10)	0,66±0,01 p<0,01	0,31±0,02 p<0,0001

Таблица рассмотрения вопроса об ограничении использования и нормировании содержания данной добавки в продуктах питания.

Выводы.

1. Экспериментально установлено, что прием пищевой добавки каррагинан в течение 28 дней приводит к ускоренной гибели эпите-

лиоцитов слизистой оболочки и развитию выраженного межучасточного воспаления в тонком кишечнике. Иммуногистохимически выявленная активация синтеза и выделения ИЛ-1 α в слизистой тонкого кишечника подтверждает интенсивность текущего воспалительного процесса.

2. Усиленная гибель эпителиоцитов слизистой оболочки сопровождается активацией пролиферативных процессов, о чем свидетельствует усиление экспрессии антигена Ki-67. Активная пролиферация эпителиоцитов является репаративной реакцией

организма на прием каррагинана. При дальнейшем употреблении каррагинана можно ожидать исчерпанности репаративного потенциала с образованием эрозий и язв в кишечнике.

Перспективы дальнейших исследований.

Полученные нами данные обосновывают перспективу дальнейших исследований, направленных на изучение факторов, повышающих устойчивость слизистой оболочки кишечника к повреждающему действию пищевой добавки каррагинан.

Литература

1. Жуков, В. И. Система перекисного окисления липидов и активность апоптоза при экспериментальном хроническом гастроэнтероколите. / В. И. Жуков, А. С. Ткаченко // Науч. Вед. Бел. ун. Медицина. Фармация. – № 18 (161), Вып. 23. – С. 138-141.
2. Загорский, С. Э. Хронические воспалительные заболевания у детей и подростков (современный подход) / С. Э. Загорский, Л. М. Беляева // Минск: БелМАПО. – 2007. – С. 4-28.
3. Клименко, Н. А. О значении лейкоцитов в повышенной сосудистой проницаемости при воспалении / Н. А. Клименко, Е. А. Павлова // Бюл. экс. биол. и мед. – 1999. – № 8. – С. 165-167.
4. Патент на изобретение № 97322 от 25. 01. 12 «Спосіб моделювання хронічного гастроентероколіту»
5. Bromley M. A comparison of proliferation markers (BrdUrd, Ki-67, PCNA) determined at each cell position in the crypts of normal human colonic mucosa / M. Bromley, D. Rew, A. Becciolini et al. // Eur. J. Histochem. – 1996. – Vol. 40. – P. 89-100.
6. Bruno S. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells / S. Bruno, Z. Darynkiewich // Cell. Prolif. – 1992. – № 25. – P. 31-40.
7. Christopher J. Morris. Carrageenan-Induced Paw Edema in the Rat and Mouse / Christopher J. Morris // Inflammation Protocols. – 2003. – № 225. – P. 115-121.
8. Holt P. R. Is Ki-67 a better proliferative marker in the colon than proliferating cell nuclear antigen? / P. R. Holt, S. F. Moss, A. M. Kapetanakis // Cancer. Epidemiol., Biomarkers. Prev. – 1997. – № 6. – P. 131-135.
9. Pricolo V. E. Effects of lambda-carrageenan induced experimental enterocolitis on splenocyte function and nitric oxide production / V. E. Pricolo, S. M. Madhere, S. D. Finkelstein // J. Surg. Res. – 1996. – Vol. 66, № 1. – P. 6-11.
10. Tobacman J. K. Review of harmful gastrointestinal effects of carrageenan in animal experiments / J. K. Tobacman // Environmental Health Perspectives. – 2001. Vol. 109, № 10. – P. 983-994.

УДК 616. 341-091. 8-092. 9:577. 114. 4

МОРФОЛОГІЧНИЙ СТАН ТОНКОГО КИШЕЧНИКУ ПРИ ТРИВАЛОМУ ВЖИВАННІ ХАРЧОВОЇ ДОБАВКИ КАРАГЕНАН

Губіна-Вакулик Г. І., Ткаченко А. С., Орлова М. О.

Резюме. В експерименті вивчено патоморфологічний стан слизової оболонки тонкого кишечника з акцентуванням на визначенні експресії антигена Ki-67, як показника рівня регенерації епітеліоцитів у кишкових залозах, при тривалому систематичному (28 днів) вживанні харчової добавки карагенан. Доведена висока активність інтерстиціального запального процесу у стінці тонкого кишечника та активація проліферації епітеліоцитів тонкого кишечника.

Ключові слова: карагенан, шури, запалення, Ki-67, проліферація.

УДК 616. 341-091. 8-092. 9:577. 114. 4

МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ ТОНКОГО КИШЕЧНИКА ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ УПОТРЕБЛЕНИИ ПИЩЕВОЙ ДОБАВКИ КАРРАГИНАН

Губина-Вакулик Г. И., Ткаченко А. С., Орлова М. О.

Резюме. В эксперименте изучено патоморфологическое состояние слизистой оболочки тонкого кишечника с акцентированием на определении экспрессии провоспалительного ИЛ-1 α и экспрессии антигена Ki-67, как показателя уровня регенерации эпителиоцитов в кишечных железах, при длительном систематическом (28 дней) употреблении пищевой добавки каррагинан. Доказана высокая активность межучасточного воспалительного процесса в стенке тонкого кишечника и активация пролиферации эпителиоцитов тонкого кишечника.

Ключевые слова: каррагинан, крысы, энтерит, Ki-67, ИЛ-1 α .

UDC 616.341-091.8-092.9:577.114.4

Morphological Condition of the Small Intestine after Prolonged Intake of Food Additive Carrageenan
Gubina-Vakulik G. I., Tkachenko A. S., Orlova M. A.

Abstract. One of the potential etiological factors of chronic inflammatory bowel disease is known to be a food additive E407 (carrageenan), used in the food industry as a thickener.

The aim of the investigation was to study the morphological status of the small intestine and features of inflammation and regeneration of small intestine enterocytes during prolonged systematic intake of the food additive carrageenan.

Adult female Wistar rats were used for experiment. Rats of the basic group (10 animals) received a 1% solution of carrageenan in drinking water during 4 weeks. The control group consisted of 10 intact animals. Pieces of the small intestine (5 cm above the transition to the large intestine) were taken for morphological examination. Paraffin sections were stained with hematoxylin-eosin, Einarsson's galloycyanin-chrome alum and van Gieson's picrofuchsin. PAS-reaction was done.

Immunohistochemical reaction to Ki-67 was used for evaluation of proliferative activity of epithelial cells and immunohistochemical reaction to IL-1 α was used to evaluate the intensity of inflammatory process. Quantitative assessment of antigen Ki-67 was performed by determining the expression level in conventional units of luminescence, and quantitative assessment of IL-1 α was performed by determining the optical density of the cytoplasmic IL-1 α -producing cells in conventional units of optical density.

Intake of carrageenan during 4 weeks caused damage to the mucosal epithelium and the development of chronic interstitial inflammation. Immunohistochemical study using antibodies to IL-1 α revealed significant noticeable increase not only of IL-1 α -synthesizing cells number in the small intestine, but also the level of IL-1 α production. It was confirmed by significant increase in conventional optical density of the cytoplasm of IL-1 α -synthesizing cells in the intestinal mucosa of the basic group compared to the control group (control group – 0.17 \pm 0.01, basic group – 0.31 \pm 0.02 conventional units of optical density, $p < 0.0001$). Also increased expression of Ki-67 antigen in the proliferative zone of intestinal glands was found (control group – 0.59 \pm 0.02, basic group – 0.66 \pm 0.01 conventional units of luminescence, $p < 0.01$).

It was experimentally established found that the intake of food additive carrageenan within 28 days resulted in accelerated injuring of epithelial cells and the development of interstitial inflammation in small intestine. Immunohistochemically detected activation of IL-1 α synthesis and release in the mucosa of the small intestine confirms the intensity of the current inflammatory process. Reinforced death of epithelial cells is accompanied by activation of proliferative processes, confirmed by the increase in the expression of Ki-67 antigen. Active proliferation of enterocytes is a reparative reaction for the carrageenan intake that allows us to make a suggestion that further use of carrageenan may lead to the exhaustion of reparative capacity with the formation of erosions and ulcers in the intestine.

Key words: carrageenan, rats, inflammation, Ki-67, IL-1 α .

Рецензент – проф. Жуков В. І.
Стаття надійшла 11. 02. 2014 р.