

ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ЕНТЕРОЦИТІВ КЛУБОВОГО ВІДДІЛУ ТОНКОГО КИШЕЧНИКА ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО СТРЕСУ У РАНЬОМУ ВІЦІ

¹Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України (м. Київ, Україна)

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка (м. Київ, Україна)

Анотація. Фізіологічні наслідки стресу часто проявляються у шлунково-кишковому тракті. Актуальними стають дослідження регульованої клітинної загибелі ентероцитів клубової кишки, яка є унікальною за своїми функціями травлення та всмоктування, а також за своїм мікробним складом, за умов стресу. Мета роботи – оцінити функціональний стан ентероцитів, а саме апоптотичної і неапоптотичної (некроз і аутофагія) клітинної загибелі клубового відділу кишечника за умов експериментального стресу у ранньому віці у мишей, що раніше не було вивчено. Застосовували стрес у ранньому віці, як описану в літературі модель неонатального материнського відокремлення (12 сеансів). Отримано нові дані про те, що за умов експериментального стресу у ранньому віці спостерігається зменшення життєздатності ентероцитів та зростання апоптотичної та неапоптотичної загибелі.

Ключові слова: кишечник, ентероцити, стрес у ранньому віці.

Abstract. Physiological effects of stress are often manifested in the gastrointestinal tract. Studies of regulated cell death of ileal enterocytes, which is unique in its digestive and absorption functions, as well as in its microbial composition, under stress conditions, are becoming relevant. The aim of the study was to evaluate the functional state of enterocytes, namely apoptotic and non-apoptotic (necrosis and autophagy) cell death of the ileum under experimental early life stress in mice, which has not been studied before. Early life stress was applied as a model of neonatal maternal separation described in the literature (12 sessions). New data were obtained that under conditions of experimental early life stress, a decrease in enterocyte viability and an increase in apoptotic and non-apoptotic death were observed.

Key words: intestine, enterocytes, experimental early life stress.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

Робота виконана у 2025 році на умовах договору про наукове співробітництво Інституту фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України і Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Дослідження проводились в рамках наукової теми «Механізми та шляхи корекції регульованої загибелі клітин імунної (тимуса і лімфатичних вузлів) та репродуктивної (яєчників і сім'яників) систем», державний реєстраційний номер роботи 6541030 (відомча) у відділі імунофізіології Інституту фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України.

Вступ.

Ранній дитячий вік є критичним етапом розвитку, і стрес у цей час може збільшити ризик функціональних шлунково-кишкових розладів (ФШКР), включаючи зміни функціонального стану ентероцитів кишечника. Кишковий гомеостаз залежить від складної взаємодії мікробіоти, кишкового епітелію та імунної системи господаря. Різноманітні регуляторні механізми підтримують гомеостаз кишечника і їх збій призводить до хронічних запальних розладів. Епітеліальний шар демонструє чіткий баланс між клітинною проліферацією та загибеллю клітин, щоб підтримувати кишковий бар'єр [1-4].

Проте дисбаланс шляхів регульованої клітинної загибелі (РКЗ) ентероцитів за умов ФШКР досліджений недостатньо і вимагає детального вивчення. Обрана нами модель неонатального материнського відокремлення у гризунів є відомим експериментальним підходом до дослідження стресу у ранньому віці (СРВ), проте зміни РКЗ ентероцитів клубового

відділу кишечника за таких умов залишаються не дослідженими і вимагають вивчення.

Мета дослідження.

Оцінити функціональний стан ентероцитів, а саме апоптотичної і неапоптотичної (некроз і аутофагія) клітинної загибелі клубового відділу кишечника за умов експериментального стресу у ранньому віці у мишей, що раніше не було вивчено.

Об'єкт і методи дослідження.

Мишей лінії Альбіно (n=30) утримували за стандартизованих умов віварію, з необмеженим доступом до стандартного корму та води. Всі процедури з гризунами були схвалені Комітетом з біоетики Інституту фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України.

Модель стресу у ранньому віці (СРВ). Починаючи з 3-го по 14-й день (12 днів) після народження, мишей (матерів) щодня виймали з кліток на 3 години (з 11:30 до 14:30). Тварин контрольної групи не турбували. Мишей у кожній групі остаточно відлучали від матері на 30-й день після народження. Самок та самців розділяли у віці 7 тижнів. У віці 2,5-3,0 міс миші піддавалися дії ефірного наркозу, далі відпаровували кишечник для подальших досліджень.

Величини ваги та рівень глюкози в крові. За умов моделювання СРВ встановлено зменшення у 1,24 рази ваги тіла і зростання у 1,30 рази рівня глюкози крові у експериментальних самок.

Макроскопічний аналіз клубового відділу кишечника показав, що за умов моделювання СРВ встановлено вірогідне зменшення довжини тонкого кишечника і у 1,22 рази окружності клубової кишки у самок мишей (p<0,05). Як відомо, баланс проліферації та фізіологічного апоптозу клітин кишкового епітелію

необхідний для підтримки нормальної функції слизового бар'єру.

Гістологічне фарбування. Кишкову тканину промивали PBS, фіксували 4% розчином параформальдегіду, а потім заливали в парафін. Зрізи кишечника товщиною 5 мкм отримували за допомогою напівавтоматичного ротормого мікротома. Мікропрепарати забарвлювали гематоксиліном-еозином за стандартною методикою. Зразки аналізували на світлооптичному рівні (мікроскоп Olympus BX-41, камера Olympus C-5050 Zoom, Olympus Europe GmbH, Японія). При гістологічному дослідженні впливу CPB на бар'єрну та абсорбційну функцію клітин кишкового епітелію були виявлені зміни слизової оболонки, висоти ворсинок, глибини крипт в клубовій кишці у експериментальних групах тварин. У контрольних тварин (самці і самки) гістологічна структура клубової мала типову будову. Слизова оболонка мала добре сформовані ворсинки вкриті шаром ентероцитів та включеними бокаловидними клітинами. Під ворсинками розміщені Ліберкюнові крипти, що виконують функцію джерела стовбурових клітин та постійно оновлюють епітелій ворсинок. Підслизова оболонка тонка, під нею розміщено два шари м'язів – циркулярний та поздовжній. Патологічних змін у тканинах не виявлено (рис. 1).

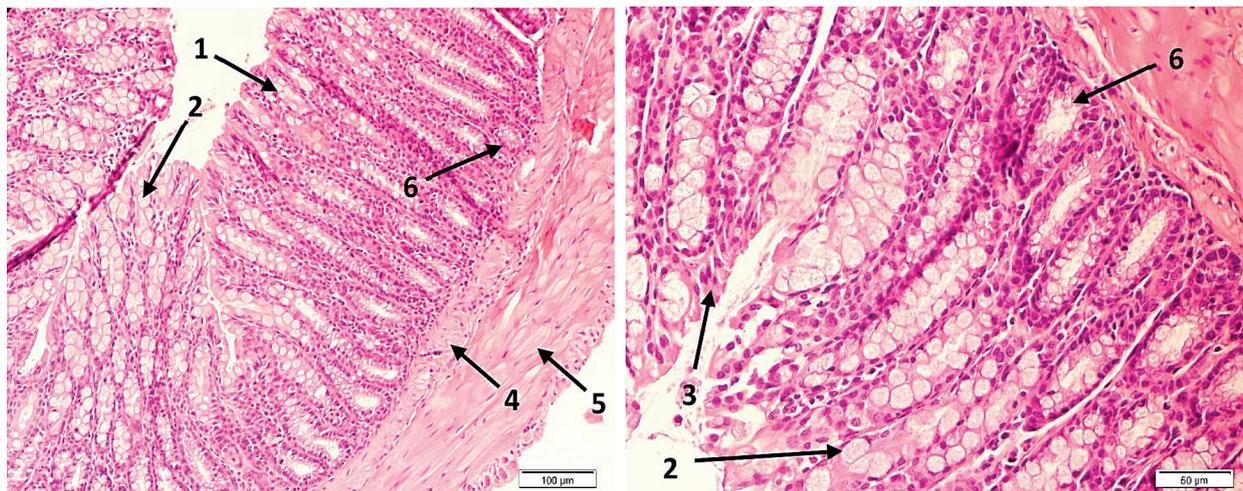


Рисунок 1 – Гістологічна структура кишки контрольних тварин. Позначення: 1 – ворсинки, 2 – бокаловидні клітини, 3 – ентероцити, 4 – циркулярний м'язовий шар, 5 – поздовжній м'язовий шар, 6 – Ліберкюнові крипти.

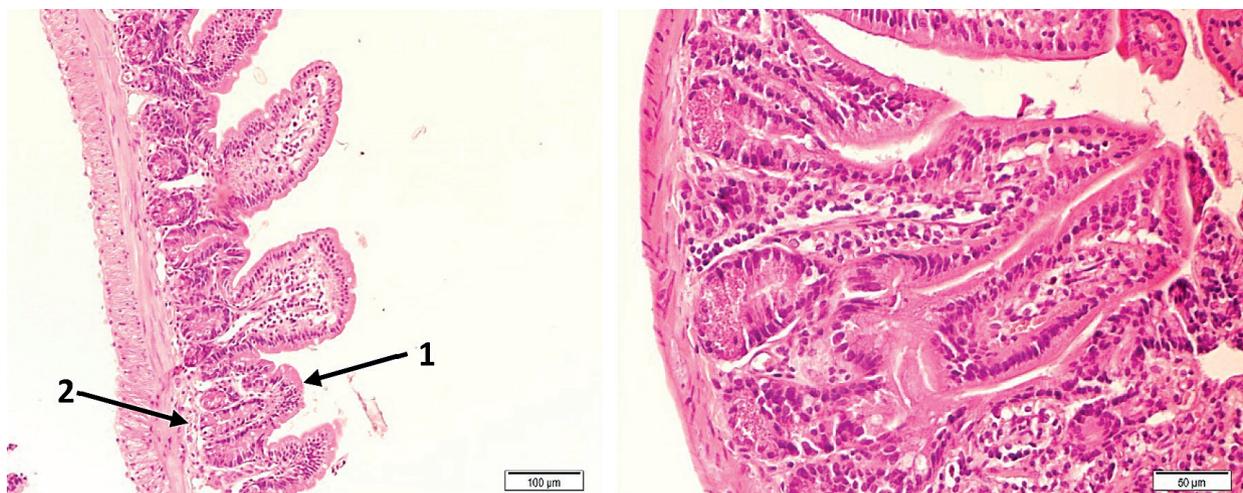


Рисунок 2 – Гістологічна структура клубової кишки мишей (самці). Позначення: 1 – деформація ворсинок, 2 – відшарування слизової оболонки.

У самців за умов CPB ворсинки були зменшені, мали неправильну форму та частково зруйнований шар ентероцитів. Було виявлено велику кількість бокаловидних клітин, порівняно з контролем. Підслизовий шар сполучної тканини мав ознаки лізису та часткового відшарування від слизової оболонки (рис. 2).

У самок за умов CPB розміри ворсинок були значно зменшені, відносно контролю. Більшість не сформовані та мали неправильну форму. Присутня велика кількість бокаловидних клітин. Виявлені ворсинки з частково зруйнованим шаром ентероцитів. Підслизовий шар сполучної тканини мав ознаки лізису та часткового відшарування від слизової оболонки. М'язовий шар без патологічних змін (рис. 3).

Дані вказують на те, що за умов CPB відбувається структурні зміни клубового відділу кишечника у обох статей, проте більші ушкодження виявлено у групі самок. Таким чином, проведений гістологічний аналіз демонструє зміну структури слизової кишечника, що може свідчити про порушення кишкового бар'єру за умов CPB.

Виділення ентероцитів за (Kimura Y, et al. 2013). Отриманий матеріал кишечника розрізати вздовж і поперек на маленькі шматочки 0,3-0,5 см; механічно виділити суспензію клітин; відфільтрувати отриману

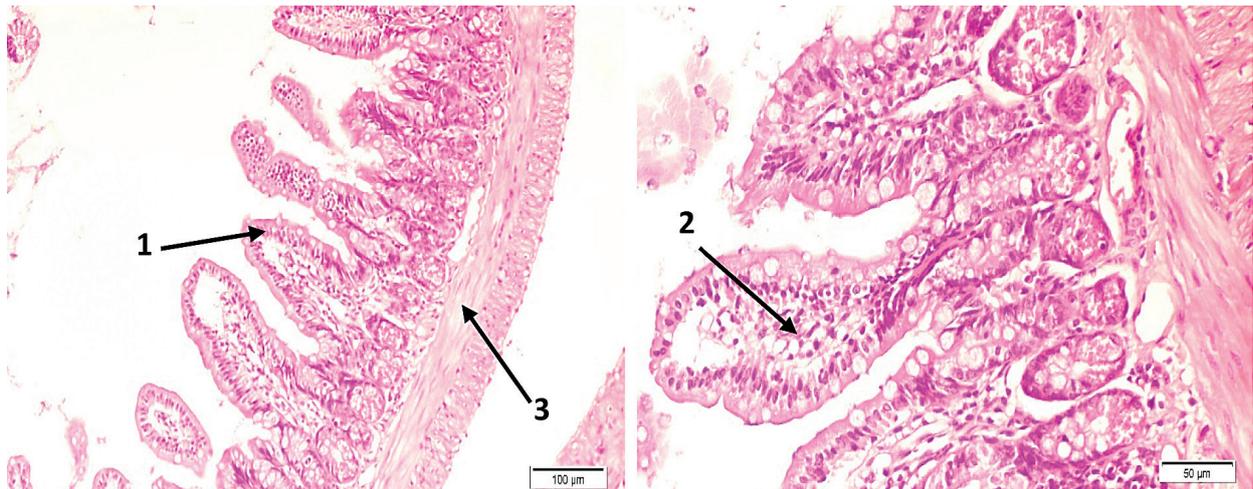


Рисунок 3 – Гістологічна структура клубової кишки мишей (самки). Позначення: 1 – деформація ворсинок, 2 – руйнування шару ентероцитів, 3 – відшарування слизової оболонки.

супензію клітин через нейлонову сітку в епіндорфі на холоді; відмити клітинну супензію за допомогою центрифугування (1200-1500 обертів/за хвилину) при температурі від 0°C до +4°C; центрифугуємо 3 рази/2 хв й тричі промивати холодним DPBS; після третього промивання клітини супендували в DPBS з 0,2% бичачим сироватковим альбуміном. Далі здійснювали методики фарбування клітин.

Імунофлуоресцентне подвійне фарбування. Використовували метод *in vivo* з двоколірним флуоресцентним нуклеїново-кислотним барвниками Hoechst 33342 та йодидом пропідію (для апоптозу), а також монодансил кадаверин (0,05 мМ) для визначення аутофагії. Апоптотичну та некротичну загибель клітин оцінювали за морфологічними характеристиками.

Аналіз даних проводили за допомогою програмного пакету GraphPad Prism 10.0. Всі дані представлені у вигляді середнього значення \pm SEM. Порівняння проводили за допомогою або однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) з подальшим множинним порівняльним *post-hoc* тестом Тьюкі. Рівень значущості $p < 0,05$ був встановлений як поріг статистичної значущості.

Результати дослідження та їх обговорення.

Дані про величини апоптотичної і неапоптотичної клітинної загибелі ентероцитів клубового відділу кишечника за умов СРВ представлено в **таблицях 1 і 2**.

Отримані результати свідчать про активацію апоптотичної і некротичної загибелі ентероцитів за умов СРВ. Встановлено, що за умов СРВ у самців: зменшувалася частка живих ентероцитів у 1,26 разів, збільшувалася у 1,70 рази кількість некротичних клітин та у 2,12 рази апоптотичних клітин. У самок мишей спостерігалось зниження живих клітин у 1,6 разів, зростання клітин з ознаками некрозу у 2,78 рази, апоптозу – у 3,07 рази, порівняно з даними значеннями у контрольних тварин. Посилений апоптоз клітин кишкового епітелію за даних експериментальних умов може призвести до пошкодження кишкового слизового бар'єру, що далі може викликати серйозні пошкодження кишечника.

Отримані результати демонструють активацію аутофагічної загибелі у самців і самок мишей. Зокрема аутофагічні процеси у ентероцитах самців зросли у 2,14 рази, а у самок – 2,86 рази, порівняно з такими величинами у контрольних тварин.

Таким чином, за умов моделювання СРВ збільшується у 1,44 рази кількість некротичних клітин, у 1,40 рази апоптотичних клітин і у 1,21 рази аутофагічних ентероцитів у самок мишей порівняно з такими величинами у самців.

Нині активно вивчається вплив стресу на клінічний перебіг запальних захворювань кишечника та ФШКР, до яких на лежать функціональна диспепсія і синдром подразненого кишечника [5, 6]. ФШКР є поширеним явищем у всьому світі, що зустрічається у близько 40% населення, частіше у жінок, ніж у чоловіків та зменшується з віком [7]. Відомо, що стрес через «відокремлення від матері» у мишей призводить до поведінкових порушень та дисбактеріозу кишкової мікробіоти, які зберігаються і в дорослому

Таблиця 1 – Частки живих, апоптотичних та некротичних ентероцитів клубового відділу тонкого кишечника за умов СРВ

Група тварин	Живі	Некротичні	Апоптотичні
Контроль самці	82,00 \pm 2,07	6,63 \pm 1,06	11,38 \pm 1,30
СРВ самці	64,60 \pm 3,49 *	11,30 \pm 1,77 *	24,10 \pm 2,76 **
Контроль самки	83,13 \pm 2,42	5,88 \pm 1,36	11,00 \pm 1,31
СРВ самки	49,88 \pm 2,59 ** #	16,35 \pm 1,66 **#	33,83 \pm 1,58 ** #

Примітки: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ – вірогідність відмінностей середньогрупових даних щодо цих змін у тварин контрольної групи; # $p < 0,05$ – вірогідність відмінностей середньогрупових даних самок щодо величин цих змін у самців.

Таблиця 2 – Частки живих та аутофагічних ентероцитів клубового відділу тонкого кишечника за умов СРВ

Група тварин	Неаутофагічні	Аутофагічні
Контроль самці	82,17 \pm 2,07	17,83 \pm 2,07
СРВ самці	61,66 \pm 1,48 *	38,33 \pm 1,48 *
Контроль самки	83,83 \pm 1,87	16,17 \pm 0,84
СРВ самки	53,67 \pm 1,14 ** #	46,33 \pm 1,14 ** #

Примітки: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ – вірогідність відмінностей середньогрупових даних щодо цих змін у тварин контрольної групи; # $p < 0,05$ – вірогідність відмінностей середньогрупових даних самок щодо величин цих змін у самців.

віці [8]. Нещодавні дослідження виявили, що фрагментарна материнська опіка мишей протягом критичного періоду новонародженості, починаючи з 2го по 9й постнатальний день, підвищувала рівень дофамінового рецептора D2R та пригнічувала експресію D4R, зокрема в передній поясній корі [9].

Висновки. Стрес у ранньому віці посилює апоптотичну та неапоптотичну загибель ентероцитів клубового відділу тонкого кишечника.

Отримані результати можуть мати значення для розуміння патофізіології кишкових розладів, пов'язаних зі стресом.

Література

1. Negroni A, Cucchiara S, Stronati L. Apoptosis, necrosis, and necroptosis in the gut and intestinal homeostasis. *Mediat Inflamm.* 2015;2015:250762. DOI: [10.1155/2015/250762](https://doi.org/10.1155/2015/250762).
2. Atrooz F, Alkadhi KA, Salim S. Understanding stress: insights from rodent models. *Curr Res Neurobiol.* 2021;23(2):100013. DOI: [10.1016/j.crneur.2021.100013](https://doi.org/10.1016/j.crneur.2021.100013).
3. Gong W, Guo P, Li Y, Liu L, Yan R, Liu S, et al. Role of the gut-brain axis in the shared genetic etiology between gastrointestinal tract diseases and psychiatric disorders: a genome-wide pleiotropic analysis. *JAMA Psychiatr.* 2023;80(4):360-70. DOI: [10.1001/jamapsychiatry.2022.4974](https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2022.4974).
4. Borrego-Ruiz A, Borrego JJ. Early Life Stress and Gut Microbiome Dysbiosis: A Narrative Review. *Stresses.* 2025;5(2):38. DOI: [10.3390/stresses5020038](https://doi.org/10.3390/stresses5020038).
5. Belei O, Basaca DG, Olariu L, Pantea M, Bozgan D, Nanu A, et al. The Interaction between Stress and Inflammatory Bowel Disease in Pediatric and Adult Patients. *Journal of Clinical Medicine.* 2024;13(5):1361. DOI: [10.3390/jcm13051361](https://doi.org/10.3390/jcm13051361).
6. Onofrijchuk JA, Solovyova GA, Bogomaz VM, Kozak NP, Skrypnychenko SV, Onofrijchuk YA. Clinical features, anxiety and depression among patients with irritable bowel syndrome with constipation and Hashimoto's thyroiditis with hypothyroidism. *Modern Gastroenterol.* 2024;1:14-8. DOI: [10.30978/MG-2024-1-14](https://doi.org/10.30978/MG-2024-1-14).
7. Fikree A, Byrne P. Management of functional gastrointestinal disorders. *Clin Med (Lond).* 2021;21(1):44-52. DOI: [10.7861/clinmed.2020-0980](https://doi.org/10.7861/clinmed.2020-0980).
8. Wang H, Jing B, Zou J, Lan T, Hu M, Lin L, et al. Sexual dimorphism in colon is mediated by an androgen-IL33+ stromal cell axis. *Cell Biosci.* 2025;15:148. DOI: [10.1186/s13578-025-01493-9](https://doi.org/10.1186/s13578-025-01493-9).
9. Makino Y, Hodgson NW, Doenier E, Serbin AV, Osada K, Artoni P, et al. Sleep-sensitive dopamine receptor expression in male mice underlies attention deficits after a critical period of early adversity. *Sci Transl Med.* 2024;16(768):eadh9763. DOI: [10.1126/scitranslmed.adh9763](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.adh9763).