

## ПОЛОВЫЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ РАЗЛИЧИЯ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ОБОДОЧНОЙ КИШКИ У ПОЛОВОЗРЕЛЫХ МЫШЕЙ C57BL/6

Гао Ю.

## THE SEX-SPECIFIC MORPHOLOGICAL DIFFERENCES OF MUCOSAL LAYER OF COLON IN ADULT C57BL/6 MICE

GAO Y.

*Кафедра клеточной биологии и гистологии (зав. кафедрой - профессор Г.Е. Онищенко) МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва; лаборатория иммуноморфологии воспаления (руководитель - профессор О.В. Макарова) ФГБНУ «НИИ морфологии человека» РАН, г. Москва.*

Половые структурно-функциональные различия толстой кишки недостаточно изучены. Цель исследования - изучение половых различий структурных компонентов слизистой оболочки разных отделов ободочной кишки у половозрелых мышей C57BL/6. Проводили измерения массы тела, длины ободочной кишки, морфологическое и морфометрическое исследование слизистой оболочки ободочной кишки у половозрелых самцов и самок мышей C57BL/6. По сравнению с половозрелыми самками у самцов мышей больше показатели массы тела и длины ободочной кишки. По сравнению с самками у самцов в слизистой оболочке ободочной кишки и, особенно в её дистальном отделе, выше объемная доля бокаловидных клеток и клеточных элементов, что отражает большую выраженность компарментов слизистого и иммунологического барьеров. Выявленные половые гистофизиологические различия ободочной кишки и её отделов, очевидно, определяют особенности течения патологических процессов в зависимости от пола и отдела толстой кишки.

**Ключевые слова:** *половые различия, ободочная кишка, мыши C57BL/6, морфология.*

The morphofunctional differences of colon between sexes are not well studied. The goal of this research is to study the sexual difference of structural components of mucosal layer in different parts of colon in adult mice of C57BL/6 strain. The body mass and the length of colon were evaluated and the morphological and morphometric evaluation of mucosal layer were conducted in adult male and female mice of C57BL/6 strain. In comparison with adult females, males tended to have more body weight and longer colon. In colon mucosa, especially in the distal colon, there was greater volumetric proportion of goblet cells and other cell elements,

which could reflect the greater intensity of mucosal and immunological compartments. These sex differences in histophysiology of colon and its parts, evidently, predetermine the course of pathological processes in different parts of colon and in different sexes.

**Key words:** *sex differences, colon, C57BL/6 mice, morphology.*

**Введение.** Половые гистофизиологические особенности желудочно-кишечного тракта и, в частности, толстой кишки в норме у человека и экспериментальных животных изучены недостаточно. J.W. Lampe и соавт. [1] выявили у человека половые функциональные различия толстой кишки, которые характеризуются тем, что у мужчин по сравнению с женщинами время прохождения кала по толстой кишке более длительное, а содержание желчных кислот более высокое. Эстрогены и прогестерон оказывают влияние на желудочно-кишечный тракт, снижают тонус сфинктера пищевода, замедляют прохождение содержимого по толстой кишке, повышают двигательную активность гладкой мускулатуры желчного пузыря и тонус сфинктера Одди, уменьшают ток желчи через выводное отверстие желчевыводящего протока [2]. Влияние циклических изменений женских половых стероидных гормонов на функцию кишечника представлены в работе M. Heitkemper et al. [3]. По сравнению с фолликулярной в лютеиновую фазу менструального цикла у женщин чаще наблюдаются запоры. Полагают, что физиологические эффекты половых стероидов опосредованы простагландинами, уровень которых в эту фазу менструального цикла увеличивается, что вызывает повышение секреторной активности и тонуса гладкой мускулатуры толстой кишки [4]. M.A. Kamn и соавт. [5], оценивая у женщин время прохождения пищи по желудочно-кишечному тракту и массу кала, также выявили зависимость этих показателей от фазы менструального цикла. Кроме простагландинов, на моторику толстой кишки влияет также уровень серотонина, 95% которого образуется EC-клетками желудочно-кишечного тракта [6, 7].

Данные литературы о половых гистофизиологических различиях толстой кишки у человека и экспериментальных животных отсутствуют.

**Цель исследования** - изучить половые различия структурных компонентов слизистой оболочки разных отделов ободочной кишки у половозрелых мышей C57BL/6.

**Материал и методы исследования.** Работа выполнена на половозрелых мышах линии C57BL/6 - самках (n=10) и самцах (n=10), полученных из питомника «Столбовая». Возраст мышей составлял 6-8 недель. При работе с экспериментальными животными руководствовались приказом Минздрава СССР №755 от 12.08.1977 г. На проведение эксперимента получено разрешение биоэтической комиссии ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН.

Животных содержали по 10 особей в клетке на подстилке из древесных стружек в условиях искусственного освещения (по 12 часов светлого и темного времени суток), принудительной вентиляции (12-кратной в час), при температуре 18-22° и относительной влажности 50-65%. Животные имели свободный доступ к питьевой воде и брикетированному корму ПК-120-1 (ООО «Лабораторснаб»).

Фазу эстрального цикла определяли по влагалищным мазкам [8] ежедневно в течение 12 дней до начала эксперимента. По клеточному составу окрашенных методом Романовского-Гимзе мазков влагалищного содержимого определяли наличие эстрального цикла и его фазу. Нормальный цикл выявлен из 17 мышей у 10 (60%), и эти животные были использованы в эксперименте.

Мышей выводили из эксперимента путем цервикальной дислокации под эфирным наркозом. Ободочную кишку выделяли из брюшной полости и измеряли ее длину в сантиметрах.

Для гистологического исследования проводили забор дистального, медиального и проксимального отделов ободочной кишки. Материал фиксировали в жидкости Буэна. Образцы тканей проводили по спиртовым растворам возрастающих концентраций, заливали в парафин, изготавливали гистологические препараты. Проводку материала осуществляли в аппарате Tissue-Tek VIP5Jr (Sakura, Japan). Обезвоженные образцы заливали в гистомикс на аппарате Tissue-Tek TEC (Sakura, Japan), изготавливали продольно ориентированные гистологические срезы толщиной 4-6 мкм на микротоме модели Microm HM340E (Thermo Scientific, USA), монтировали их на предметные стекла, проводили стандартную гистологическую обработку препаратов и окрашивали их гематоксилином и эозином. Анализ и съемку гистологических препаратов проводили на микроскопе AxioPlan 2 Imaging (Carl Zeiss, Germany)

с цифровой камерой AxioCam RHC (Carl Zeiss, Germany).

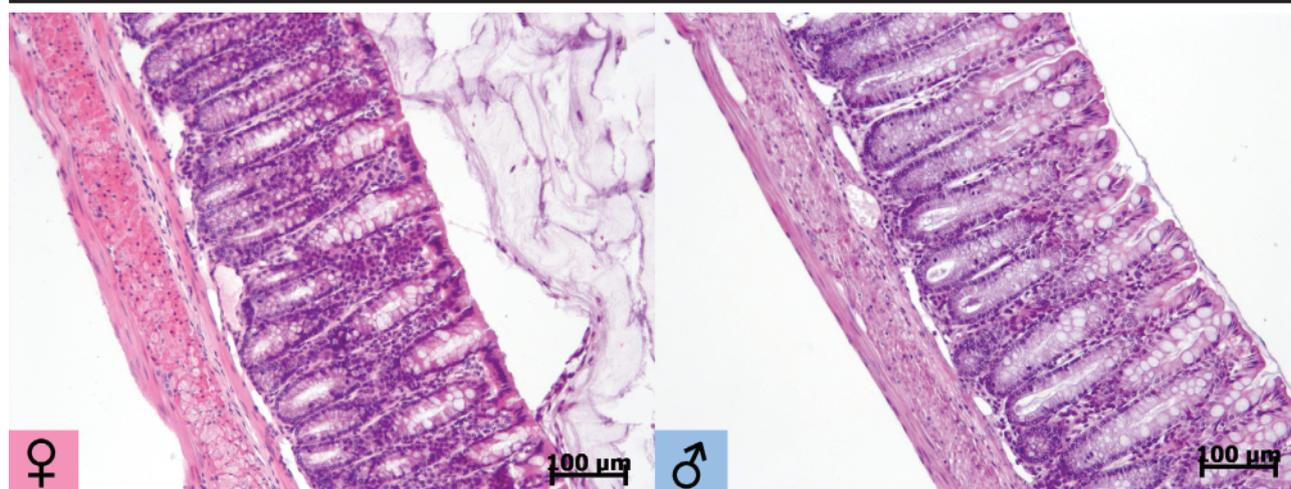
На окрашенных гематоксилином и эозином гистологических срезах в собственной пластинке слизистой оболочки проксимального, медиального и дистального отделов ободочной кишки при увеличении 100 проводили подсчет числа лимфоидных узелков на протяжении всех трех отделов. Методом точечного счета при увеличении 200 оценивали объемную плотность структурных компонентов слизистой оболочки – бокаловидных клеток, колоноцитов, просвета крипт, соединительной ткани, сосудов и клеточных элементов в собственной пластинке слизистой оболочки.

Статистическую обработку показателей проводили с учетом характера распределения непараметрическими методами (U-критерий Манна-Уитни) в программе Statistica 8.0. Вычисляли медиану и интерквартильный размах – 25%-75%. Различия считали достоверными при  $p \leq 0,05$ .

**Результаты исследования.** По сравнению с самцами у самок показатели массы тела ( $P < 0.001$ ; самки-21.0 (20.0, 22.0), самцы- 24.8 (22.8, 25.5)) и длины ободочной кишки ( $P < 0.02$ ; самки-5.0 (4.5, 5.3), самцы- 6.0 (5.3, 6.0)) была меньше.

В эпителиальной выстилке ободочной кишки у мышей обоего пола выявлялись колоноциты и бокаловидные клетки овальной формы. На поверхности эпителиального слоя и в узких просветах крипт определялась слизь. Базальная пластинка была тонкой, собственная пластинка слизистой оболочки образована рыхлой волокнистой соединительной тканью, содержащей небольшое количество диффузно рассеянных клеточных элементов: макрофагов, лимфоцитов, единичных плазмочитов, а также фибробластов и фиброцитов. В базальном отделе собственной пластики слизистой оболочки выявлялись щелевидные лимфатические сосуды. Мышечная пластинка была образована 2-3 рядами продольно ориентированных гладкомышечных клеток. Подслизистая основа была представлена рыхлой волокнистой соединительной тканью с небольшим количеством диффузно рассеянных клеточных элементов – макрофагов, лимфоцитов, фибробластов, фиброцитов, единичных в поле зрения (увеличение 400) нейтрофилов. Кровеносные сосуды - артерии и вены, венулы и артериолы, капилляры неравномерно полнокровны. Мышечная оболочка образована внутренним циркулярным и наружным продольно ориентированным слоями. Лейомиоциты представлены темными и светлыми клетками. Серозная оболочка была образована тонким слоем рыхлой волокнистой соединительной ткани и уплощенным мезотелием (рис. 1)

Количество лимфоидных узелков в слизистой оболочке ободочной кишки у самок и самцов



**Рис. 1.** Гистоструктура стенки ободочной кишки у половозрелых самок и самцов мышей C57BL/6. Крипты глубокие с узкими просветами. Эпителиальная выстилка сохранена на всем протяжении. Цитоплазма бокаловидных клеток заполнена секретом. Подслизистая основа представлена узким слоем соединительной ткани. В базальных отделах собственной пластинки слизистой оболочки лимфатические сосуды со щелевидными просветами. Мышечная оболочка представлена циркулярным и продольным слоями гладкой мускулатуры. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 160.

мышей C57BL/6 статистически значимо не различалось (табл. 1).

Морфометрическая оценка структурных компонентов стенки ободочной кишки позволила установить, что у самок по сравнению с самцами среди клеток эпителиальной выстилки ниже

показатель объемной доли бокаловидных клеток и клеточных элементов в собственной пластинке слизистой оболочки, но выше колоноцитов, соединительной ткани и сосудов (табл. 2).

В проксимальном и дистальном отделах ободочной кишки у самок по сравнению с сам-

**Таблица 1.**

**Количество лимфоидных узелков в гистологических срезах ободочной кишки у самок и самцов мышей C57BL/6**

Параметры	Проксимальный отдел	Медиальный отдел	Дистальный отдел	Все отделы ободочной кишки
Самки	0.00 (0.00,1.00)	0.00 (0.00,2.00)	1.00 (1.00,3.00)	3.00 (1.00,5.00)
Самцы	0.00 (0.00,0.00)	0.00 (0.00,1.00)	2.00 (0.00,4.00)	2.50 (2.00,4.00)
Статистическая значимость	0.23	0.95	0.84	0.73
Статистическая значимость между отделами	Проксимальный и медиальный	Проксимальный и дистальный	Медиальный и дистальный	-
Самки	0.95	0.03	0.13	
Самцы	0.39	0.06	0.18	

Таблица 2.

**Морфометрическая характеристика структурных компонентов слизистой оболочки ободочной кишки у самок и самцов мышей C57BL/6**

Параметры	Показатели всех отделов ободочной кишки в %		
	Самки	Самцы	Статистическая значимость
Бокаловидные клетки	42.04 (37.55,47.86)	59.36 (54.57,65.33)	<0.001
Колоноциты	171.32 (158.15,177.08)	154.72 (149.62,163.61)	<0.001
Просветы крипт	19.91 (16.76,24.49)	29.69 (25.68,32.27)	0.08
Соединительная ткань, сосуды	36.30 (32.32,43.19)	15.94 (17.33,24.59)	<0.001
Клеточные элемент	15.47 (10.49,19.46)	25.86 (19.30,28.27)	<0.001

цами среди клеток эпителиальной выстилки был ниже показатель объемной доли бокаловидных клеток и клеточных элементов. В медиальном отделе ободочной кишки половых различий этих показателей не выявлено (табл. 3). Показатели просвета крипт в проксимальном и дистальном отделах ободочной кишки у самок были выше, чем у самцов. Объемная доля соединительной ткани и сосудов в собственной пластинке слизистой оболочки у самок была выше, по сравнению с самцами только в дистальном отделе. Количество лимфоидных узелков в дистальном отделе ободочной кишки было выше, чем в дистальном у мышей обоего пола, но статистически значимые различия показателей выявлены только у самок.

Таким образом, половые гистофизиологические различия ободочной кишки у половозрелых мышей C57BL/6 (табл. 3) характеризуются тем, что у самцов по сравнению с самками: выше показатели длины ободочной кишки и объемной доли бокаловидных клеток в эпителиальной выстилке и клеток в собственной пластинке слизистой оболочки. Половые различия ободочной кишки наиболее выражены в проксимальном и дистальном отделах.

**Обсуждение результатов исследования.**

Данные о половых гистофизиологических различиях толстой кишки у человека и экспериментальных животных в литературе представлены недостаточно. Половые различия характеризуются тем, что по сравнению с женщинами у мужчин больше длина толстой кишки, масса кала и содержание в нем желчных кислот [1].

По нашим данным длина ободочной кишки у половозрелых самцов мышей C57BL/6 была

выше, чем у самок той же линии на 17%. Большая длина ободочной кишки у самцов определяется тем, что масса их тела больше, чем у самок, и, соответственно, у них более высокая потребность в питательных веществах [9], и количество потребляемой пищи выше. E. Pullianainen и P. Tunkkari [10] показали, что у самцов и самок птицы (*Lagopus lagopus* – белая куропатка) длина ободочной кишки изменяется в зависимости от сезона года. У половозрелых самцов и самок в июле она не отличается, а весной и осенью показатели её длины выше у самок, что связано с сезонным повышением уровня половых гормонов.

По сравнению с половозрелыми самцами у самок мышей C57BL/6 с нормальным эстральным циклом в эпителиальной выстилке ободочной кишки меньше показатели объёмной доли бокаловидных клеток и клеточных элементов в собственной пластинке слизистой оболочки. Большие показатели объёмной доли бокаловидных клеток в эпителиальном пласте ободочной кишки у самцов, по-видимому, обусловлены изменением под влиянием тестостерона экспрессии генов Notch и Math сигнальных путей, играющих ключевую роль в процессе дифференцировки кишечного эпителия. Высокая экспрессия Notch гена в эпителии кишки у мышей обуславливает уменьшение популяции секреторных клеток [11], напротив, ингибирование Notch пути приводит к увеличению численности популяций секреторных клеток в эпителиальном пласте [12]. Xi-De Wang et al. [13] на экспериментальных животных показали, что в раннем постнатальном периоде при низком уровне тестостерона повышается экспрессия гена Notch 1 в эпителии предстательной железы, а в

**Таблица 3.**  
**Морфометрическая характеристика структурных компонентов слизистой оболочки разных отделов ободочной кишки у самок и самцов мышей C57BL/6**

Параметры	Показатели в %, самки			Показатели в %, самцы				Статистическая значимость между самками и самцами		
	Проксимальный отдел	Медиальный отдел	Дистальный отдел	Проксимальный отдел	Медиальный отдел	Дистальный отдел	Проксимальный отдел	Медиальный отдел	Дистальный отдел	
Бокаловидные клетки	16.20 (12.50, 17.50)	10.69 (9.60, 14.28)	16.88 (13.84, 20.00)	25.43 (22.58, 27.46)	10.56 (9.54, 14.07)	20.08 (17.07, 28.39)	<0.001	0.84	<0.001	
Колоноциты	57.65 (47.27, 60.56)	62.72 (59.41, 67.17)	51.28 (47.43, 56.25)	40.31 (37.21, 43.65)	61.93 (59.74, 67.19)	48.72 (44.31, 60.56)	<0.001	0.87	0.78	
Просветы крипт	7.81 (6.49, 9.09)	6.01 (3.88, 8.00)	7.14 (5.12, 8.97)	5.45 (3.17, 7.67)	5.71 (3.48, 8.11)	4.08 (2.53, 6.49)	0.02	0.96	0.01	
Соединительная ткань, сосуды	10.76 (5.88, 13.33)	12.51 (10.12, 14.37)	14.28 (12.64, 17.18)	7.54 (5.57, 10.47)	10.52 (8.95, 12.68)	10.97 (6.81, 13.79)	0.17	0.09	<0.001	
Клеточные элемент	4.94 (2.66, 11.11)	3.79 (3.20, 6.13)	3.84 (2.59, 4.68)	12.32 (10.57, 14.45)	5.47 (2.56, 6.86)	7.13 (5.17, 11.11)	<0.001	0.23	<0.001	

период половой зрелости при высоком уровне тестостерона экспрессия снижается. Эти данные косвенно свидетельствуют о регуляции Notch пути андрогенами. Данные о влиянии эстрадиола на экспрессию гена Notch и его влиянии на дифференцировку эпителия в литературе отсутствуют.

Таким образом, выявленное нами увеличение у самцов мышей C57BL/6 содержания в эпителиальном слое ободочной кишки бокаловидных клеток, по-видимому, отражает супрессию Notch пути дифференцировки эпителия тестостероном и, соответственно, повышение экспрессии генов Math, которые ответственны за дифференцировку эпителия в секреторные клетки.

В эпителиальной выстилке дистального и проксимального отдела ободочной кишки, в отличие от медиального, показатель объёмной доли бокаловидных клеток выше как у самок, так и у самцов. Количество лимфоидных узлов в дистальном отделе ободочной кишки у самок выше, чем в проксимальном.

По данным литературы, восходящий и нисходящий отделы толстой кишки имеют различные источники эмбрионального развития. Восходящая и поперечная ободочная кишка у человека формируются из туловищной кишки; а нисходящая и сигмовидная - из задней кишки [14, 15]. Показано, что восходящий и нисходящий отделы ободочной кишки у человека соответствуют медиальному и дистальному отделам кишки у мыши. На биопсийном материале у здоровых людей методом DNA microarray в эпителиальных клетках слизистой оболочки восходящей и нисходящей ободочной кишки выявлены различия по экспрессии 214 генов у взрослых лиц и 87 – у плодов [16]. При язвенном колите у человека поражается преимущественно нисходящий отдел ободочной кишки [17], а при раке толстой кишки чаще вовлекается восходящая ободочная кишка [16]. Опухоли, локализованные в этом отделе, имеют более злокачественное течение. Кроме того, различия клинического течения и локализации воспалительных и опухолевых процессов в толстой кишке, могут быть связаны с метаболизмом глюкозы и желчных кислот, а также градиентом концентрации желчных кислот [16].

Выявление нами половые гистофизиологические различия ободочной кишки и её отделов, очевидно, определяют особенности течения патологических процессов в зависимости от пола и отдела толстой кишки.

#### **Выводы.**

1) По сравнению с половозрелыми самками у самцов мышей C57BL/6 больше показатели массы тела и длины ободочной кишки.

2) По сравнению с самками у самцов в слизистой оболочке ободочной кишки и, особенно

в её дистальном отделе, выше объёмная доля бокаловидных клеток и клеточных элементов, что отражает большую выраженность компартментов слизистого и иммунологического барьера.

#### **ЛИТЕРАТУРА:**

1. Lampe J.W., Fredstrom S.B., Slavin J.L., Potter J.D. Sex differences in colonic function: a randomized Trial// *Gut*. – 1993 – №34(4). – p. 531-536.
2. Eliakim R., Abulafia O., Sherer D.M. Hyperemesis gravidarum: a current review// *Am. J. Perinatol.* – 2000 – №17(4). – p.207-18.
3. Heitkemper M.M., Shaver J.F., Mitchell E.S. Gastrointestinal symptoms and bowel patterns across the menstrual cycle in dymenorreic and nondymenorreic women// *Nurs.Res.* – 1988 – №37(2). – p.108-113.
4. Kane S., Stone L.J., Ehrenpreis E. Thalidomide as “salvage” therapy for patients with delayed hypersensitivity response to infliximab: a case series// *J. Clin. Gastroenterol.* – 2002 – №47(3). – p. 149-150.
5. Kamm M.A., Fartning M.J. G. and Lennard-Jones J.E. Bowel function and transit rate during the menstrual cycle// *Gut*. – 1989 – №30(5). – p. 605-608.
6. Camilleri M., Atanasova E., Carlson P.J., Ahmad U., Kim H.J., Viramontes B.E., McKinzie S., Urrutia R. Serotonin-transporter polymorphism pharmacogenetics in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome// *Gastroenterology*. – 2002 – №123(2). – p.425-432.
7. Scherl E., Frissora C.L. Irritable bowel syndrome genophenomics: correlation of serotonin-transporter polymorphisms and alosetron response// *Pharmacogenomics. J.* – 2003 – №41. – p. 64-66.
8. Кабак Я.М. Практикум по эндокринологии// М.: изд-во МГУ. – 1968 –. 275 с.
9. Moss R., Parkinson J.A. The digestion of heather (*Calluna vulgaris*) by red grouse (*Lagopus lagopus scoticus*)// *Br J Nutr* – 1972 – p.285-298.
10. Pullianien E., Tunkkari P. Seasonal changes in the gut length of the willow grouse (*Lagopus lagopus*) in Finnish Lapland // *Ann. Zool. Fennici*. – 1983 – №20. – p.53-56.
11. Zecchini V., Domaschenz R., Winton D., Jones P. Notch signaling regulates the differentiation of post-mitotic intestinal epithelial cells// *Genes. Dev.* – 2005 – №12. – p. 1686-1691.
12. Van Es J.H., Jay P., Gregorieff A., van Gijn M.E., Jonkheer S., Hatzis P., Thiele A., van den Born M., Begthel H., Brabletz T., Taketo M.M., Clevers H. Wnt signalling induces maturation of Paneth cells in intestinal crypts// *Nat. Cell. Biol.* – 2005 – №3. – p. 381-386.
13. Wang Xi-De, Ching Ching Leow, Jiping Zha, Zhijun Tang. Notch signaling is required for normal prostatic

*epithelial cell proliferation and differentiation// Developmental Biologi. – 2006 – №290. – p. 286-294.*

14. Bufill J.A. *Colorectal cancer: evidence for distinct genetic categories based on proximal or distal tumor location// Ann. Intern. Med. – 1990 – №113(10). – p.779–788.*

15. Bonithon-Kopp C., Benchemiche A.M. *Are there several colorectal cancers? Epidemiological data// Eur. J. Cancer. Prev. – 1999 – №8(1). – p.3-12.*

16. Glebov O.K., Rodriguez L.M., Nakahara K., Jenkins J., Cliatt J., Humbyrd C.J., DeNobile J., Soballe P., Simon R., Wright G., Lynch P., Patterson S., Lynch H., Gallinger S., Buchbinder A., Gordon G., Hawk E., Kirsch I.R. *Distinguishing right from left colon by the pattern of gene expression// Cancer. Epidemiol. Biomarkers. Prev. – 2003 – №12(8). – p.755-762.*

17. Белоусова Е.А. *Иммунные механизмы при воспалительных заболеваниях кишечника и принци-*

*пы селективной иммунокоррекции// Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 1992 – № 7. – с. 2-10.*

**REFERENCES:**

8. Kabak YA.M. *Practical work on endocrinology// M.: publ. MSU. –1968 –. p.275.*

17. Belousova E.A. *Immune mechanisms in inflammatory bowel disease and the principles of selective immunomodulation// Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology. – 1992 – № 7. – p. 2-10.*

**Авторская справка:**

Гао Юань – аспирант кафедры клеточной биологии и гистологии МГУ им. М.В. Ломоносова; г. Москва; АДРЕСС 119991, РФ, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, МГУ им. М.В. Ломоносова, комната Б304; т. 89251579218; e-mail: gaoyuan@inbox.ru