

ЗООЛОГІЯ

УДК:576.08+591.43:598.243.3

Ликова І.О.: ORCID 0000-0003-1347-2077, Scopus AuthorID: 57205081127

Харченко Л.П. ORCID 0000-0003-4948-2744

ОЦІНКА МІТОТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ В КРИПТАХ ЕПІТЕЛІЮ ТОНКОГО КИШЕЧНИКУ *CALIDRIS ALPINA* (LINNAEUS, 1758)

© Ликова І.О.¹, Харченко Л.П.²

¹Харківський національний педагогічний університет імені Г.С. Сковороди

²Полтавський національний педагогічний університет імені В.Г. Короленка

irlyk16@gmail.com

harchenko.lp1402@gmail.com

<https://doi.org/10.34142/2708-5848.2023.25.1.01>

В даній роботі проаналізовано інтенсивність регенераційних процесів епітелію в тонкому кишечнику побережника чорногрудого *Calidris alpina* (Linnaeus, 1758) під час міграційних зупинок. Активне живлення птахів під час міграційних зупинок сприяє підвищенню метаболічних процесів в організмі птахів. Процеси всмоктування поживних речовин прискорюються, що призводить до швидкого виснаження облямованих ентероцитів на верхівці кишкових ворсинок. Наслідком цього є підвищення темпів регенерації кишкового епітелію. На сьогодні регенераційні потенції кишкового епітелію добре вивчені у ссавців та частково у домашніх видів птахів, на диких видах птахів такі дослідження не проводились. В роботі наведено коротку характеристику гістологічної будови стінки тонкого кишечника побережника чорногрудого та описано цитологічний склад кишкових крипт. Вивчення мікроструктури крипт тонкого кишечника *C. alpina* показало, що на відміну від епітелію ворсинок, до складу крипт входять не лише облямовані стовпчасті ентероцити та ендокриноцити, а також стовбурові клітини, клітини-попередниці, клітини, що диференціюються на різних стадіях розвитку та клітини Панета. Проліферативна активність крипт визначена шляхом обрахунку мітотичного індексу (МІ) в криптах тонкого кишечника *C. alpina*, за оцінкою якого визначено відділ з найвищими показниками МІ в криптах. За результатами проведених досліджень встановлено, що в криптах дванадцятипалої кишки МІ збільшується в дистальному напрямку і в каудальному відділі дорівнює 21.35%. Найвищі показники МІ зафіксовано в криптах краніальної частини порожньої кишки –25.65%. В каудальному відділі клубової кишки відмічена тенденція до зниження показників МІ в криптах до 16.5%. Оцінка МІ в клітинах крипт тонкого кишечника *C. alpina* показала, що всі відділи тонкого кишечника мають високі показники МІ в криптах. Найвищі значення МІ епітеліоцитів крипт було зафіксовано у порожній кишці, що свідчить про інтенсифікацію процесів травлення в цьому відділі і високу проліфераційну активність його епітелію. Отримані результати є ще одним свідченням пластичності травної системи птахів-мігрантів.

Ключові слова: *Calidris alpina* (Linnaeus, 1758), птахи-мігранти, живлення, тонкий кишечник, мітотичний індекс.

Адаптації птахів до сезонних міграцій були і залишаються об'єктом вивчення в орнітології. Успішність міграційних перельотів напряму залежить від здатності птахів-мігрантів швидко переключатися на доступні на міграційних зупинках корми. Птахи-мігранти, які тривалий час можуть обходитись без їжі, здатні швидко переключатися на нові корми і за короткі строки відновлювати свої енергетичні резерви. Адаптуватися до таких змін птахам дозволяє універсальність їх травної системи [8].

Модельними об'єктами для вивчення адаптацій під час міграцій є кулики (Charadrii), які відносяться до однієї з найбільш численних і різноманітних у видовому відношенні груп вітчизняної орнітофауни. Одним із найчисленніших видів куликів, який використовує водноболотні угіддя України під час тимчасових міграційних зупинок є побережник чорногрудий *Calidris alpina* (Linnaeus, 1758).

Особливості будови травної системи куликів як мігрантів досліджені і описані в сучасній літературі [6], але недостатньо вивчені механізми, які сприяють швидко-

му засвоєнню кормів і ефективному травленню у куликів на міграційних зупинках.

Попередні дослідження показали, що за час міграційної зупинки травна система *C. alpina* швидко адаптується до інтенсивного живлення, відбувається збільшення загальної маси травної системи та зміни в архітектоніці рельєфу тонкого кишечника [7]. Ці зміни обумовлені збільшенням висоти кишкових ворсинок і їх щільності в тонкому кишечнику. Актуальним, на наш погляд, залишається дослідження регенераційних властивостей кишкового епітелію у птахів-мігрантів, а саме проліферативної активності камбіальних клітин у кишкових криптах під час міграційних зупинок.

Загальновідомо, що регенерацію кишкового епітелію забезпечують кишкові крипти, які утворюються шляхом інвагінації епітелію у сполучну тканину стінки кишкової трубки. Кожна крипта містить приблизно 250 клітин, залежно від її виду та анатомічного розташування. Розмір і організація крипт зазвичай однакові в межах певної ділянки шлунково-кишкового тракту. З основних типів епітеліальних клітин кишечника всі, крім клітин Панета, у міру дозрівання рухаються вгору до просвіту кишки [2]. Таким чином, відбувається постійна висхідна міграція клітин епітелію, а їх розташування у складі епітелію кишкових ворсинок вказує на їх стадію в процесі дозрівання. Місцем початку міграційних процесів епітеліальних клітин є бокові ділянки крипти, на дні яких розташовані стовбурові клітини (СК), які відповідальні за гомеостаз і регенерацію кишкового епітелію.

Ряд досліджень регенераційних потенцій шлунково-кишкового тракту пропонують модель кооперативної ієрархії стовбурових клітин, в якій проліферативні стовбурові клітини задовольняють щоденні потреби тканини, а спокійні "резервні" стовбурові клітини сприяють регенерації тканин після цитотоксичного пошкодження [13].

Більшість сучасних досліджень зосереджені на вивченні загальної ніші стовбурових клітин та клітин, що їх

оточують і створюють певне мікросередовище. У цьому контексті стовбурові клітини розглядаються переважно як реципієнти хімічних і механічних сигналів для подальшого поділу [3].

Регенераційні властивості кишкового епітелію у ссавців і людини вивчені на достатньо високому рівні [1-3, 11]. В тонкому кишечнику ссавців за допомогою математичного моделювання проведено кількісну оцінку клітинної проліферації та міграції ентероцитів за нормальних умов, коли проліферація зменшується та під час її зупинки, визначено час, необхідний клітині для міграції від основи крипти до вершини ворсинки [10]. Останніми тенденціями в сучасних дослідженнях регенераційних потенцій кишкового епітелію є створення кишкових органоїдів, так званих «міні кишок», які представляють собою самоорганізовані тривимірні органо подібні конструктори. Такі «міні кишки» повністю повторюють фізіологію кишкового епітелію, що містить як стовбурові так і диференційовані клітини. Ця система культивування широко використовується для вивчення захворювань шлунково-кишкового тракту та фізіології кишечника ссавців і людини, але не часто використовується для вивчення епітеліальних клітин кишечника птахів. Більшість досліджень на птахах базуються на короткочасних дослідженнях первинних культур ентероцитів домашніх видів птахів [14]. У диких птахів такі дослідження не проводились, даних щодо проліферативної активності кишкового епітелію у птахів-мігрантів досить мало [12].

Актуальність теми обумовлена відсутністю комплексних досліджень щодо механізмів регенерації кишкового епітелію під час активного живлення птахів-мігрантів на міграційних зупинках. Інтенсивність оновлення ентероцитів кишечника у куликів на сьогодні в літературі не описана. Саме тому метою нашого дослідження було описання механізмів регенерації ентероцитів в кишечнику *C. alpina* та їх інтенсивності під час міграційних зупинок.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Матеріалом для даних досліджень були гістологічні препарати тонкого кишечнику *C. alpina*, виготовлені під час дослідження травної системи куликів у 2011-2015 рр. Постійні гістологічні препарати кишечнику *C. alpina* виготовляли за загальноприйнятими методиками, забарвлювали гемато-ксиліном та еозином [9].

За допомогою постійних гістологічних препаратів кишечнику нами було проведено оцінку зміни мітотичного індексу в клітинах кишкових крипт *C. alpina*. Дослідження та фотографування проводили за допомогою мікроскопу Optika B-383 PLi (Італія) з фотонасадкою

Sigeta M3CMOS 18.0 MP з використанням програмного забезпечення TopView і ноутбука Dell p2aL. Проліферативну активність кишкового епітелію визначали за допомогою розрахунку мітотичного індексу (МІ) в криптах тонкого кишечнику. За для цього підраховували в криптах епітеліоцити з чотирма стадіями мітозу, які зустрічаються на 100 клітин. Мітотичний індекс визначали за формулою: $MI = M_1 : M_2 \times 100\%$, де МІ – мітотичний індекс; M_1 – кількість клітин з фігурами мітозу; M_2 – кількість клітин, які досліджувались (100). Отримані результати обробляли статистично з використанням програм Microsoft EXCEL.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Гістологічна будова кишечнику *C. alpina* була описана нами під час дослідження особливостей травної системи куликів (Charadrii) [7-8]. Попередні дослідження показали, що стінка тонкого кишечнику *C. alpina* складається з серозної і м'язової оболонок, підслизової основи і слизової оболонки, яка вистелена одношаровим призматичним облямованим епітелієм та має складну просторову організацію. Ворсинки слизової оболонки тонкого кишечнику утворюють анастомози, що збільшує загальну всмоктувальну поверхню тонкого кишечнику. Всмоктування поживних речовин забезпечується кишковими еритроцитами, які щільно вкривають поверхню ворсинок слизової оболонки.

Кишкові ворсинки на поверхні вистелені одношаровим призматичним епітелієм до складу якого входять стовпчасті (облямовані) ентероцити, клітини, що складають найбільшу (до 90%) частку всіх епітеліоцитів (рис. 1). Вони виконують основну функцію – всмоктування поживних речовин. Другий тип клітин, який входить до складу епітелію ворсинок – келихоподібні екзокриноцити. Клітини, які виробляють вуглеводно-протеїнові комплекси – муцини, що виконують захисну функцію і сприяють просуванню їжі в кишечнику.

Кількість цих клітин в дистальному напрямку кишечнику збільшується (рис. 1), що сприяє кращій обробці хімусу травними ферментами і покращує його просування по кишечнику.

Вивчення мікроструктури крипт тонкого кишечнику *C. alpina* показало, що на відміну від епітелію ворсинок, до складу крипт входять не лише облямовані стовпчасті ентероцити та ендокриноцити, а також стовбурові клітини, клітини-попередники, клітини, що диференціюються на різних стадіях розвитку та клітини Панета.

Як відомо з літератури [2], на дні крипт розташовуються клітини Панета (поодинокі або невеликими групами) (рис. 2), які секретують лізоцим (фермент, який має антибактеріальні властивості) та дефензин (антибіотик) та сприяють нейтралізації соляної кислоти. Клітини Панета впливають на недиференційовані ентероцити на дні крипт і на клітини, що ампліфікуються, беруть участь у регенерації абсорбційних і секреторних типів клітин. Зазначається, що клітини Панета беруть участь у конфігурації та функціонуванні зони стовбурових клітин, у кишковому морфогенезі та діленні крипт, а також необхідні для виробництва та секреції антимікробних пептидів, які

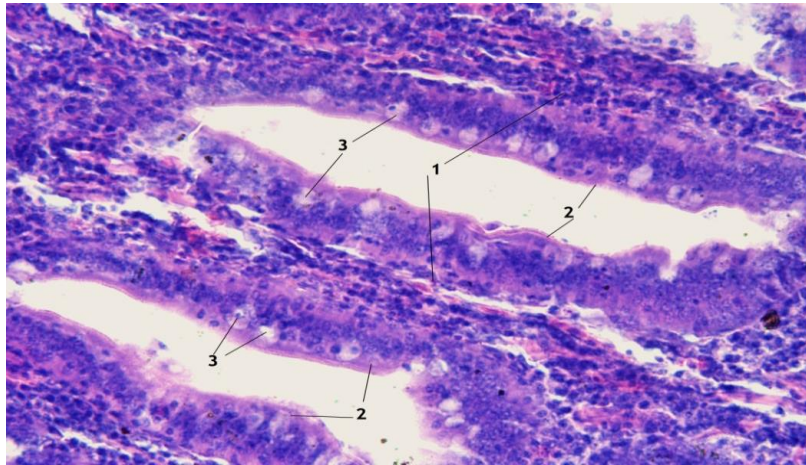


Рис. 1. Гістологічна будова ворсинок слизової оболонки дванадцятипалої кишки побережника чорногрудого (*Calidris alpina* L.). Гістопрепарат (гематоксилін і еозин, х400). 1 – ворсинки слизової оболонки, 2 – облямовані ентероцити, 3 – келихоподібні ентероцити.

фізіологічно беруть участь у формуванні складу мікробіому [4]. Також на дні крипт розташовуються малодиференційовані стовбурові клітини (СК), які характеризуються відсутністю морфологічних та біохімічних ознак, які притаманні іншим ентероцитам (рис. 2, 3). Саме поділ цих клітин підтримує стовбуровий пул крипти. Ці клітини локалізовані на дні крипти та на 2-3 клітинних діаметри вище дна.

З літературних даних [2] відомо, що кількість СК в крипті може варіювати в діапазоні від 0,4% до 60% клітин крипт, що означає, що хоча б одна стовбурова клітина зустрічається в кожній крипті. СК

є недиференційованими щодо інших типів епітеліальних клітин, але не обов'язково відносно ембріональних клітин, і здатними до проліферації та самопідтримки, продукуючи багато диференційованого потомства та регенеруючи тканину після пошкодження. Зміни в кількості СК можуть змінити час циклу стовбурових клітин, кількість поділів перед диференціюванням, кількість ліній, які зазвичай генерує або здатна генерувати кожна стовбурова клітина, і кількість клітин, здатних забезпечити регенерацію тканини після пошкодження [2].

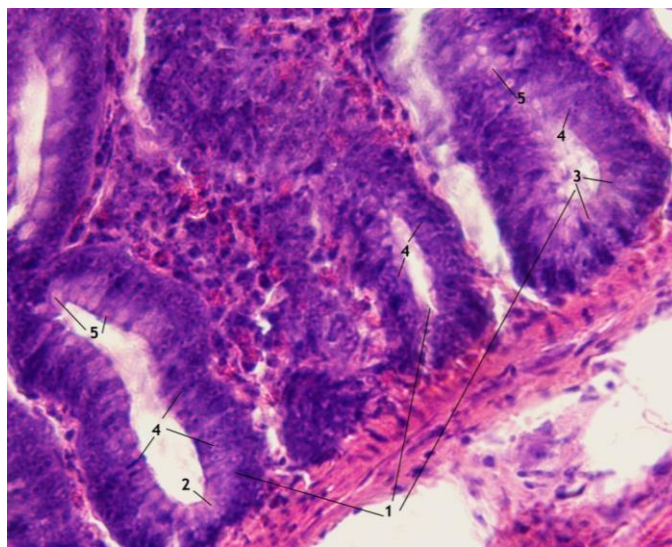
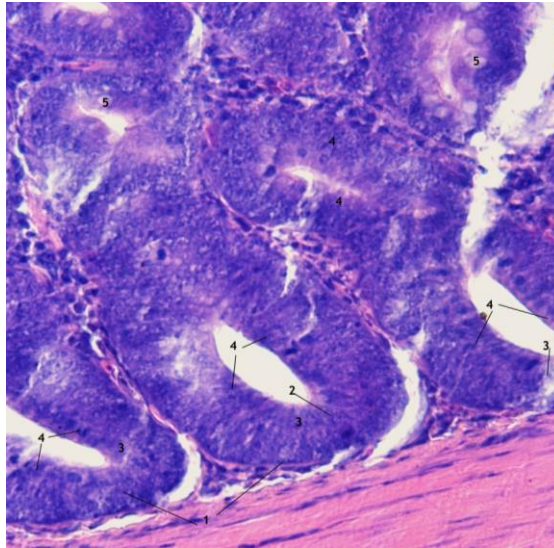


Рис. 2. Крипти в стінці слизової оболонки дванадцятипалої кишки побережника чорногрудого (*Calidris alpina* L.). Гістопрепарат (гематоксилін і еозин, х400). 1 – крипти, 2 – клітини Панета, 3 – недиференційовані СК, 4 – клітини з фігурами мітозів, 5 – екзокриноцити.



Б

Рис. 3. Крипти в стінці слизової оболонки клубової кишки побережника чорногрудого (*Calidris alpina* L.). Гістопрепарат (гематоксилін і еозин, x400). 1 – крипти, 2 – клітини Панета, 3 – недиференційовані СК, 4 – клітини з фігурами мітозів, 5 – екзокриноцити.

По боках крипти розташовуються клітини на різних стадіях диференціації. Саме серед цих клітин знаходяться ентероцити на різних стадіях мітозу та вже диференційовані клітини (облямовані ентероцити, М-клітини та ендокриноцити) (рис. 2, 3).

Як було зазначено вище, активне живлення *C. alpina* на міграційних зупинках сприяє підвищенню метаболічних процесів в організмі птахів. Процеси всмоктування поживних речовин прискорюються, що призводить до швидкого виснаження облямованих

ентероцитів на верхівці ворсинок. Наслідком цього є підвищення темпів регенерації кишкового епітелію. Оцінити інтенсивність регенераційних процесів можна за кількістю ентероцитів у бокових ділянках крипт, які знаходяться на різних стадіях мітозу, тобто визначивши мітотичний індекс (МІ) крипт.

З цією метою ми провели підрахунок клітин з фігурами мітозу в 100 полях зору в кожному відділі тонкого кишечника та проаналізували зміни МІ в дистальному напрямку тонкого кишечника. Отримані дані наведені в таблиці 1.

Таблиця 1.

Мітотичний індекс (МІ) в криптах тонкого кишечника побережника чорногрудого (*Calidris alpina* L.)

Відділ тонкого кишечника	МІ (%)	
	Краніальний відділ	Каудальний відділ
Дванадцятипала кишка	18.43±1.22	21.35±1.87*
Порожня кишка	25.65±1.98	22.48±2.08*
Клубова кишка	20.25±2.19	16.51±1.76*

* – $p < 0.05$ (за t-критерієм Ст'юдента)

За результатами проведених розрахунків встановлено, що МІ в криптах дванадцятипалої кишки збільшується в дистальному напрямку і в каудальному відділі дорівнює 21.35% (табл. 1).

Найвищі показники МІ ми зафіксували в криптах краніальної частини

порожньої кишки (25.65%). Надалі спостерігали тенденцію до зниження МІ (рис. 4). В каудальному відділі клубової кишки МІ в криптах складав близько 16.5%.

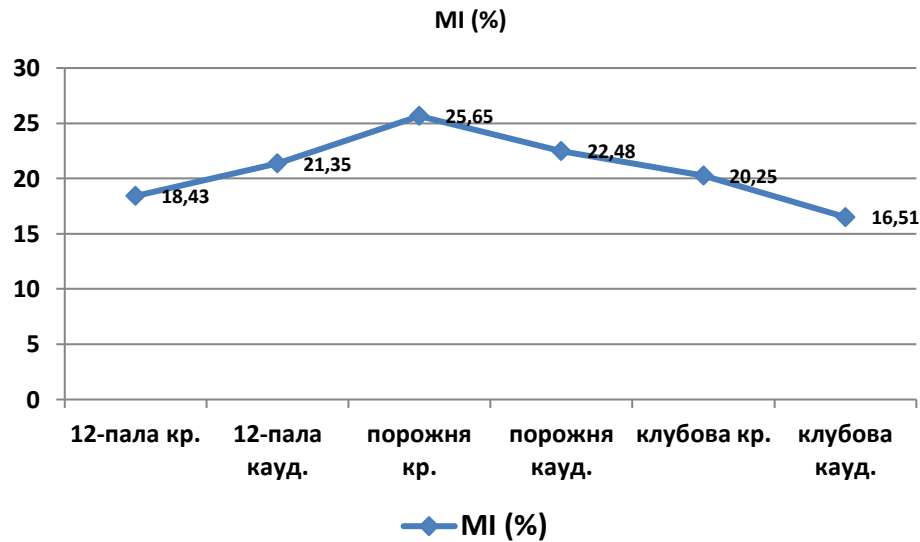


Рис. 4. Динаміка зміни мітотичного індексу (MI) в криптах тонкого кишечника побережника чорногрудого (*Calidris alpina* L.)

Аналізуючи літературні джерела, ми не виявили аналогічних даних щодо показників MI в криптах птахів. Щодо інтенсивності проліферації ентероцитів, Д. Старком [12] встановлено, що проліферація ентероцитів кишечника птахів прискорюється завдяки зменшенню інтервалу S-фази, під час якої відбувається реплікація ДНК, що зумовлює прискорення мітотичного поділу камбіальних клітин.

Порівнюючи отримані дані з даними щодо змін MI в криптах тонкого кишечника ссавців [11], можемо відмітити, що MI в криптах тонкого кишечника *C. alpina* є значно вищий, ніж у криптах ссавців і має вищі показники, порівняно із тваринами, які зазнавали уражень іонізуючим опроміненням або іншими факторами, які стимулюють регенераційні процеси в криптах тонкого кишечника.

Таким чином, можемо припустити, що на міграційних зупинках активне живлення птахів призводить до швидкої регенерації кишкового епітелію, що сприяє інтенсифікації процесів травлення. Підтвердженням тому є високий мітотичний індекс епітеліоцитів кишкових крипт тонкого кишечника *C. alpina*.

ПІДСУМОК

Активне живлення *C. alpina* під час міграційних зупинок сприяє інтенсифікації процесів травлення. Адаптуватися до швидкої зміни кормів і їх кількості птахам допомагає пластичність їх травної системи, яка обумовлена здатністю швидко реагувати на прискорення процесів травлення і забезпечувати високу інтенсивність регенераційних процесів епітелію кишечника. Найбільш інтенсивно процеси всмоктування поживних речовин відбуваються в тонкому кишечнику, що призводить до швидкого зношування клітин епітелію, який його вистилає. Джерелом регенерації кишкового епітелію слугують стовбурові клітини, розташовані в криптах тонкого кишечника, які під час активного живлення прискорюють процеси активації поділу в клітинах крипт. Оцінка мітотичного індексу в клітинах крипт тонкого кишечника *C. alpina* показала, що всі відділи тонкого кишечника мають високі показники MI в криптах. Найвищі значення MI епітеліоцитів крипт було зафіксовано у порожній кишці, що свідчить про інтенсифікацію процесів травлення в цьому відділі і високу проліфераційну активність його епітелію.

REFERENCE

1. Blanpain C., Fuchs E. (2015) Stem cell plasticity. Plasticity of epithelial stem cells in tissue regeneration. *Science* 344: 1242281. DOI: 10.1126/science.1242281
2. Booth C., Potten C. (2000) Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells. *The Journal of Clinical Investigation* 105(11): 1493-1499. [online]. Available from: <https://www.jci.org/articles/view/10229>
3. Ferraces-Riegas P., Galbraith A.C., Doupé D.P. (2022) Epithelial stem cells: making, shaping and breaking the niche. *Adv Exp Med Biol - Cell Biology and Translational Medicine* 1387: 1-12. DOI: 10.1007/5584_2021_6 86
4. Gassler N. (2017) Paneth cells in intestinal physiology and pathophysiology. *World J Gastrointest Pathophysiol* 8(4): 150–160. DOI: 10.4291/wjgp.v8.i4.150
5. Kharchenko L. P., Lykova I. O. (2014) Histological structure of the digestive tract waders (Aves, Charadrii). *Visn. Dnipropetr. Univ. Ser. Biol. Ekol* 22(2): 122–132. (In Ukr.)
6. Kovtun, M. F., Lykova, I. O., Kharchenko, L. P. (2018) The Plasticity and Morphofunctional Organization of the Digestive System of Waders (Charadrii) as Migrants. *Vestnik Zoologii* 52(5): 417–428.
7. Lykova I. O. (2014) Dynamics of digestive morphometric parameters of waders at migratory stopover sites. *Biology and valeology* 16: 29–36. (In Ukr.)
8. Lykova I. O., Kharchenko L. P. (2016) Anatomy-histological structure of intestine of waders (Charadrii) as migrants. *Biology and valeology* 18: 44–56. (In Ukr.)
9. Lilly R. (1969) *Pathological technique and practical histochemistry*. Moscow: Myr. (In Russ.)
10. Parker A., Maclaren O.J., Fletcher A. G., Muraro D., Kreuzaler P.A., Byrne H.M., Maini P.K., Watson A. J. M., Pin C. (2017) Cell proliferation within small intestinal crypts is the principal driving force for cell migration on villi. *The Faceb Journal* 31(2): 636-649. DOI: 10.1096/fj.201601002
11. Potten C. S., Roberts S. A., Chwalinski S., Loeffler M., Paulus U. (1988). Scoring mitotic activity in longitudinal sections in crypts of the small intestine. *Cell and Tissue Kinetics* 21(4): 231-246. DOI: 10.1111/j.1365-2184.1988.tb00783.x
12. Starck J. M. Phenotypic plasticity, cellular dynamics, and epithelial turnover of the intestine of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *J. Zool.* 1(238): 53–79.
13. Tetteh P.W., Farin H.F., Clevers H. (2015) Plasticity within stem cell hierarchies in mammalian epithelia. *Trends Cell Biol.* 25: 100–108.
14. Zhao D., Farnell M.B., Kogut M.H., Genovese K.J., Chapkin R.S., Davidson L.A., Berghman L.R., Farnell Y.Z. (2022) From crypts to enteroids: establishment and characterization of avian intestinal organoids. *Poultry Science* 101(3): 1-11. DOI: 10.1016/j.psj.2021.101642

UDC 576.08+591.43:598.243.3

ASSESSMENT OF MITOTIC ACTIVITY IN THE CRYPTS OF THE SMALL INTESTINAL EPITHELIUM OF *CALIDRIS ALPINA* (LINNAEUS, 1758)

Lykova I.O., Kharchenko L.P.

In the article the intensity of epithelial regeneration processes in the small intestine of the Dunlin *Calidris alpina* (Linnaeus, 1758) during migration stops was analyzed. The active feeding of birds during migration stops contributes to the increase of metabolic processes in the body of birds. The processes of absorption of nutrients are accelerated, which leads to the rapid exhaustion of bordered enterocytes at the top of the intestinal villi. The consequence of this is an increase in the rate of regeneration of the intestinal epithelium. To date, the regenerative potential of the intestinal epithelium has been well studied in mammals and partly in domestic bird species; such studies have not been conducted on wild bird species. The paper gives a brief description of the histological structure of the wall of the small intestine of the black-breasted sea bream and describes the cellular composition of the intestinal crypts. The study (analysis) of the microstructure of the crypts of the small intestine of *C. alpina* showed that the villous epithelium, the crypts include not only bordered columnar enterocytes and endocrinocytes, but also stem cells, progenitor cells, cells differentiating at different stages of development, and Paneth cells. The proliferative activity of the crypts was carried out by calculating the mitotic index (MI) in the crypts of the small intestine of *C. alpina*, based on which the part with the highest indicators of MI in the crypts was determined. According to the results of the conducted studies (research), it was established that in the crypts of the duodenum MI increases in the distal direction and in the caudal part equals 21.35%. The highest rates of MI were recorded in the crypts of the cranial part of the jejunum – 25.65%. In the caudal part of the ileum, a tendency of MI indicators decreasing to 16.5% in the crypts was noted. Evaluation of MI in the crypt cells of the small intestine of *C. alpina* showed that all sections of the small intestine have high levels of MI in the crypts. The highest MI values of crypt epitheliocytes were recorded in the jejunum, which indicates the intensification of digestion processes in this department and the high proliferative activity of its epithelium. The obtained results are the evidence of the plasticity of the digestive system of migratory birds.

Key words: *Calidris alpina* (Linnaeus, 1758), migratory birds, nutrition, small intestine, mitotic index.