



Оригинальное исследование
УДК 611.3:599.323.4-001.8-092.9
<http://dx.doi.org/10.35177/1994-5191-2023-2-10>

АКТИВНОСТЬ 3β -ГИДРОКСИСТЕРОИДДЕГИДРОГЕНАЗЫ В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ РАЗНЫХ ОТДЕЛОВ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ КРЫСЫ

Борис Яковлевич Рыжавский^{1✉}, Дмитрий Игоревич Жильников²

^{1,2}Дальневосточный государственный медицинский университет, Хабаровск, Россия

^{1✉}19151943@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4320-8341>

²aesius@zhilnikov.com, <https://orcid.org/0000-0002-8376-9813>

Аннотация. Гистохимическим методом исследована активность 3β -гидроксистероиддегидрогеназы в слизистой оболочке желудка, тонкой и толстой кишки взрослых крыс линии Вистар. Установлено, что в слизистой оболочке тонкой кишки интенсивная реакция наблюдалась в большинстве эпителиоцитов ворсинок. Продукты реакции локализовались преимущественно в апикальной части клеток, наиболее интенсивно в зоне щеточной каемки. В области крипт тонкой кишки положительная реакция наблюдалась не во всех эпителиоцитах, при этом продукты реакции располагались в апикальных частях клеток. В собственной пластинке слизистой оболочки реакция была отрицательной. В слизистой оболочке желудка и толстой кишки, как в эпителиальных клетках, так и в соединительной ткани продукты реакции не выявлялись.

Ключевые слова: 3β -гидроксистероиддегидрогеназа, слизистая оболочка, кишечник, эпителиоциты

Для цитирования: Рыжавский Б.Я. Активность 3β -гидроксистероиддегидрогеназы в слизистой оболочке разных отделов пищеварительной системы крысы / Б.Я. Рыжавский, Д.И. Жильников // Дальневосточный медицинский журнал. – 2023. – № 2. – С. 58-63. <http://dx.doi.org/10.35177/1994-5191-2023-2-10>.

ACTIVITY OF 3β -HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE IN THE MUCOSA OF DIFFERENT PARTS OF THE RAT DIGESTIVE SYSTEM

Boris Ya. Ryzhavskii^{1✉}, Dmitrii I. Zhilnikov²

^{1,2}Far Eastern State Medical University, Khabarovsk, Russia

^{1✉}19151943@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4320-8341>

²aesius@zhilnikov.com, <https://orcid.org/0000-0002-8376-9813>

Abstract. Histochemical method was used to study the activity of 3β -hydroxysteroid dehydrogenase in the gastric, small and large intestine mucosa of adult Wistar rats. It was revealed that in the mucous membrane of the small intestine, an intense reaction was observed in majority of villi epithelial cells. The reaction products were localized mainly in the apical part of the cells, most intensively in the area of the brush border. In the crypts of the small intestine, a positive reaction was not observed in all epithelial cells, while the reaction products were located in the apical parts of the cells. In its own plate of the mucous membrane, the reaction was negative. In the mucous membrane of the stomach and colon, both in epithelial cells and in connective tissue, reaction products were not detected.

Keywords: 3β -hydroxysteroid dehydrogenase, mucosa, intestines, epithelial cells

For citation: Ryzhavskii B.Ya. Activity of 3β -hydroxysteroid dehydrogenase in the mucosa of different parts of the rat digestive system / B.Ya. Ryzhavskii, D.I. Zhilnikov // Far Eastern medical journal. – 2023. – № 2. – P. 58-63. <http://dx.doi.org/10.35177/1994-5191-2023-2-10>.

3β -гидроксистероиддегидрогеназа (3β -ГСДГ) является ключевым ферментом синтеза стероидных гормонов: андрогенов, эстрогенов, гестагенов, минералокортикоидов, глюкокортикоидов, продуцируемых в гонадах, корковом веществе надпочечников, плаценте. Наличие активности этого фермента рассматривалось как свидетельство специфической способности

именно клеток данных органов к синтезу стероидных гормонов [1, 2, 3, 5, 20]. Однако в последующем было установлено, что активность 3β -ГСДГ выявляется, в том числе гистохимическим методом, не только в этих клетках. Она была обнаружена в нейронах и глиоцитах и стала рассматриваться как маркер клеток центральной и периферической нервной системы, проду-



цирующих нейростероиды [7, 8, 12, 14, 18, 19]. Таким образом, было показано, что клетки, для которых секрета стероидных гормонов не является основной функцией, также могут обладать активностью 3β -ГСДГ.

Это дает основания предполагать, что и другие клетки организма могут обладать активностью данного фермента. Известно, что субстратом для синтеза стероидных гормонов служит холестерин, главным продуцентом которого является печень, где происходит также его трансформация в желчные кислоты, являющиеся важным компонентом желчи. Другим органом, в котором также идет интенсивный синтез холестерина, является кишечник [4-6]. Холестерин пищевых продуктов, как и холестерин, входящий в состав желчи, поступает в просвет тонкой кишки, где, всасываясь эпителиоцитами, становится частью образующихся в них хиломикронов [6, 11, 15]. Изучение ферментов бактерий, способных приводить к деградации холестерина, показало, что холестериноксидаза, катализирующая распад данного вещества, обладает также способностью превращать дегидроэпиандростерон в прогестерон [9], то есть свойствами 3β -ГСДГ.

Материалы и методы

Проведена гистохимическая реакция на 3β -ГСДГ в желудке, тонкой и толстой кишке 8 взрослых (возраст 3-4 месяца) интактных крыс линии Вистар. Животные содержались в условиях одного вивария, с соблюдением документа ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными», получали в свободном доступе воду и разнообразный корм *ad libitum*. Эвтаназию животных осуществляли декапитацией под легким наркозом. Взятие материала проводилась сразу после декапитации. Для гистохимического изучения активности 3β -ГСДГ на криостате Leica (Германия) готовились срезы толщиной 10 мкм из тонкой кишки, взятой на расстоянии 4-5 см от пилорического отдела желудка, среднего отдела толстой кишки, а также – тела желудка. Срезы монтировались на покровных стеклах. Их инкубация осуществлялась в термостате при 37 °C течение 30 минут в растворе, приготовленном по [2] с использованием

Экстракты клеток, приготовленные из различных бактерий, также обладают способностью катализировать данную реакцию [10, 16].

В связи с этим заслуживают внимания данные о том, что холестериноксидаза может участвовать в разрушении холестерина, расположенного в щеточной каемке кишечных эпителиоцитов [18]. Особый интерес представляет тот факт, что способностью окислять 3β -гидроксистероиды обладает также алкогольдегидрогеназа клеток печени человека, то есть этот фермент клеток печени обладает и свойствами 3β -ГСДГ [12].

Определение активности 3β -ГСДГ в органах, являющихся продуцентами стероидных гормонов, в том числе, нейростероидов, ее изменения регистрируются гистохимическими методами [1, 2, 3, 5, 7, 8, 14]. В то же время, нами не было обнаружено данных, полученных гистохимическими методами, об активности 3β -ГСДГ в органах пищеварительного канала. Вышеизложенное определило цель данной работы: исследовать при помощи гистохимического метода наличие активности 3β -ГСДГ в слизистой оболочке желудка, тонкой и толстой кишки.

реактивов фирмы Sigma (США). В инкубационный раствор в расчете на 1 мл 0,1 М раствора фосфатного буфера (рН 7,5) вносились 1 мг НАД, 0,3 мг нитросинего тетразолия, 0,1 мг дегидроэпиандростерона. Контрольные срезы инкубировали в среде без добавления субстрата или НАД. Кроме того, для контроля реакции проводили на срезах надпочечников этих же животных. Реакцию в корковом веществе расценивали как положительный контроль, реакцию в мозговом веществе – как отрицательный контроль. Микропрепараты изучали при различных увеличениях (от 10×10 до 15×100) микроскопа МИКМЕД-6, ЛОМО (Россия). Реакция оценивалась как положительная при окраске исследуемых структур гранулами диформазана фиолетового цвета. Цифровой камерой Sony (Япония) проводилась фотосъемка препаратов, микрофотографии импортировались в компьютер и также подвергались изучению.

Результаты и обсуждение

Изучение препаратов, в которых проведены контрольные реакции, показало, что в клетках коркового вещества надпочечников наблюдалась интенсивное окрашивание продуктами реакции. Реакция в мозговом веществе была отрицательной (рис. 1). Отрицательная реакция была также в срезах, инкубированных в среде, приготовленной без НАД или – без дегидроэпиандростерона.

В слизистой оболочке тонкой кишки интенсивная реакция наблюдалась в эпителиоцитах. Она была в большинстве данных клеток, покрывающих ворсинку. При этом продукты реакции локализовались преимущественно в их апикальной части, наиболее интенсивно – в зоне щеточной каемки (рис. 2, 3). В области

крипт тонкой кишки положительная реакция наблюдалась не во всех эпителиоцитах, при этом продукты реакции располагались в апикальных частях клеток (рис. 2, 4). В собственной пластинке слизистой оболочки реакция была отрицательной, ее компоненты практически не окрашивались (рис. 2, 3).

В слизистой оболочке желудка поверхностные мукоциты и клетки, выстилающие желудочные ямки и эпителиоциты желез не окрашивались продуктами реакции. Отрицательная реакция наблюдалась и в собственной пластинке слизистой оболочки органа (рис. 5). Эпителий толстой кишки, выстилающий ее крипты и соединительная ткань слизистой оболочки также не окрашивались продуктами реакции (рис. 6).

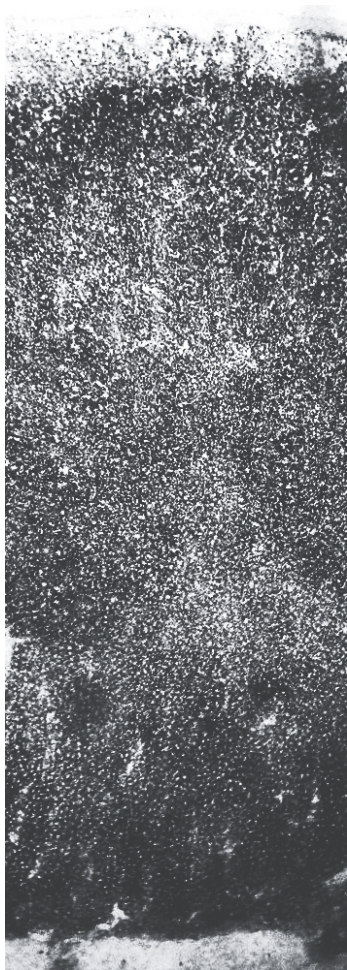


Рис. 1. Надпочечник. Реакция на ГСДГ. Интенсивная реакция в клетках коркового вещества, отсутствие реакции в мозговом веществе. Увеличение 15×10

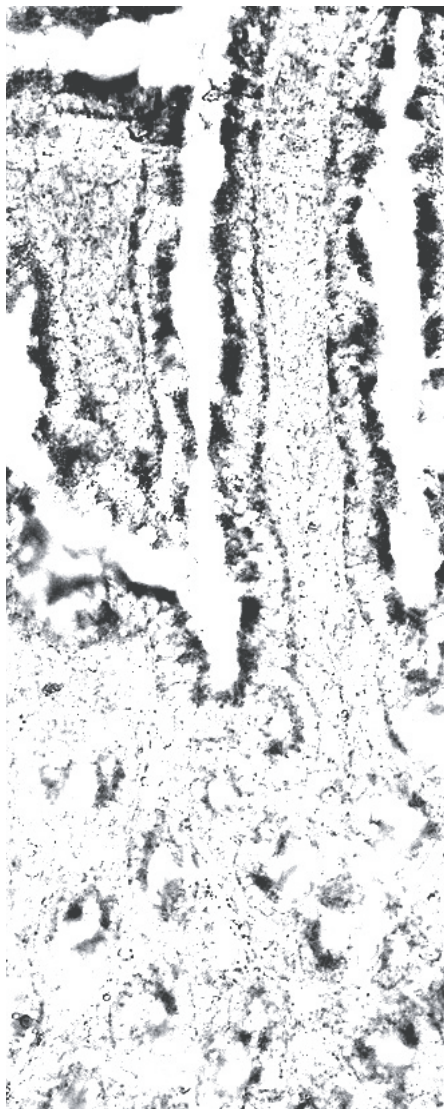


Рис. 2. Слизистая оболочка тонкой кишки. Реакция на ГСДГ. Интенсивная реакция в апикальной части эпителиоцитов ворсинки и части эпителиоцитов крипт. Увеличение 15×20



Рис. 3. Ворсинка тонкой кишки. Реакция на ГСДГ. Интенсивная реакция в апикальной части эпителиоцитов. Увеличение 15×40

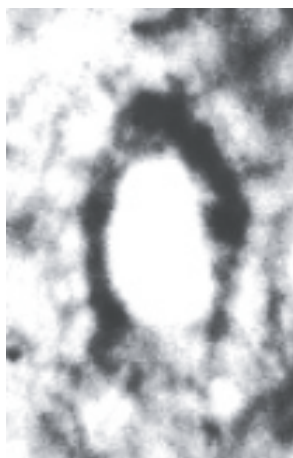


Рис. 4. Крипта в слизистой оболочке тонкой кишки. Реакция на ГСДГ. Интенсивная реакция в апикальной части эпителиоцитов. Увеличение 15×40

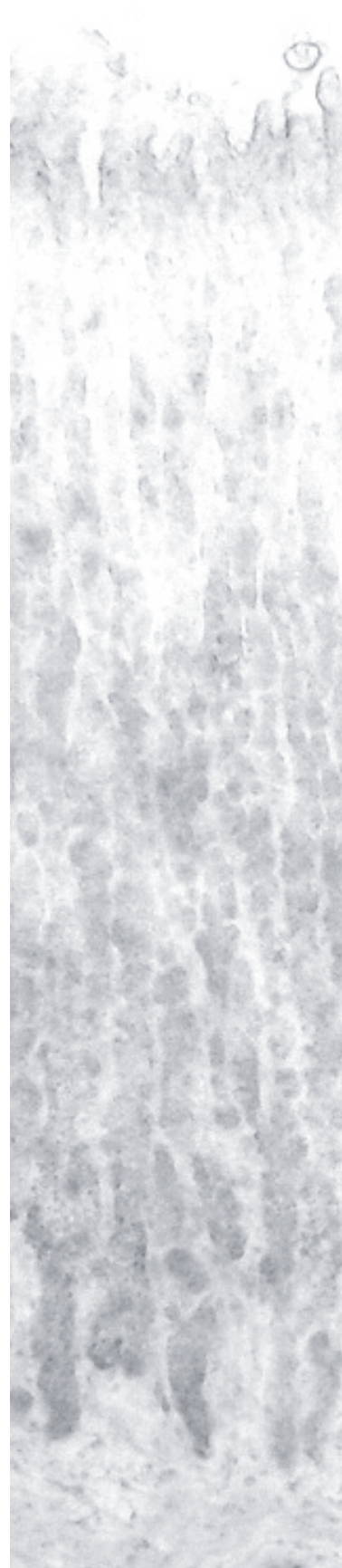


Рис. 5. Слизистая оболочка желудка. Реакция на ГСДГ. Отсутствие клеток, содержащих продукты реакции. Увеличение 15×10



Рис. 6. Слизистая оболочка толстой кишки.
Реакция на ГСДГ. Отсутствие клеток,
содержащих продукты реакции.
Увеличение 15×10

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что реакция на β -ГСДГ в тонкой кишке резко отличается от реакции в желудке и толстой кишке. Можно предполагать, что активность фермента

в эпителии тонкой кишки обуславливается рядом факторов. Среди них – высокая концентрация в ней холестерина, поступающего как в составе пищи, так и входящего в состав желчи [15], всасывание его в этом отделе кишечника [12]. Его высокая концентрация может определяться и образованием в энтероцитах хиломикронов, содержащих холестерин, а также плотным расположением в щеточной каемке микроворсинок, поскольку цитолемма, являющаяся их основной структурой, имеет высокую концентрацию данного вещества [5, 6, 13, 17, 21]. Следует также принимать во внимание, что в микроворсинках, а также в гликокаликсе локализовано большое количество различных ферментов, обеспечивающих пристеночное и мембранное пищеварение. При этом есть основания предполагать, что в гликокаликсе могут располагаться ферменты, обладающие свойствами β -ГСДГ, продуцируемые микробами, находящимися в просвете кишки [6, 11].

Таким образом, данные, полученные при использовании гистохимического метода, свидетельствуют о наличии активности β -ГСДГ в эпителиоцитах слизистой оболочки тонкой кишки. В то же время, в эпителиоцитах толстой кишки и желудка, а также в собственной пластинке слизистой оболочки исследованных органов, она не выявляется. Можно предполагать, что обнаруженные различия реакции в эпителиальных клетках изучавшихся отделов пищеварительного канала могут обуславливаться особенностями строения данных клеток, расположенных в разных отделах желудочно-кишечного тракта, связанного с выполнением ими различных функций [6]. Мы полагаем, что изложенные данные расширяют «набор» клеток, которые не входят в состав желез, секретирующих стероидные гормоны, но обладают способностью катализировать реакцию, являющуюся ключевой в образовании этих гормонов. В связи с изложенным, по нашему мнению, заслуживает внимания изучение вопроса о внутриклеточной локализации активности β -ГСДГ в эпителиоцитах тонкой кишки. Ответ на вопрос о локализации фермента в микроворсинках щеточной каемки, а также в гликокаликсе, могут дать исследования, основанные на методиках электронно-микроскопической гистохимии.

Список источников

1. Ишутина Н.А., Луценко М.Т., Андриевская И.А. Роль холестерина и эстрадиола в развитии плацентарной недостаточности при цитомегаловирусной инфекции в третьем триместре гестации // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2017. – № 65. – С. 54-58.
2. Лойда З., Госсрау Р., Шиблер Т. Гистохимия ферментов. – М.: Мир, 1982. – 270 с.
3. Луценко М.Т., Довжикова И.В. Гормональная функция плаценты при обострении цитомегаловирусной инфекции в период гестации // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2014. – № 52. – С. 62-67.
4. Ойноткинова О.Ш., Никонов Е.Л., Гиоева И.З. Роль микробиоты кишечника в патогенезе дислипидемии и ассоциированных метаболических нарушений // Доказательная гастроэнтерология. – 2017. – Т. 6, № 2. – С. 29-34.
5. Руководство по гистологии. – СПб.: СпецЛит, 2009. – Т. 1. – 831 с.
6. Руководство по гистологии. – СПб.: СпецЛит, 2011. – Т. 2. – 511 с.



7. Рыжавский Б.Я., Литвинцева Е.М. Гистохимическое выявление 3β -гидроксистероиддегидрогеназы в нейронах головного мозга крысы // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2011. – Т. 152, № 9. – С. 347-349.
8. Рыжавский Б.Я., Жильников Д.И. Гистохимический анализ 3β -гидроксистероиддегидрогеназы в нейронах ствола головного мозга крысы // Дальневосточный медицинский журнал. – 2019. – № 4. – С. 28-31.
9. Фокина В.В., Карпов М.П., Колеров В.В., Брагин Е.Ю., Эпиктетов Д.О., Свиридов А.В., Казанцев А.В., Шутов А.А., Донов М.В. Рекombинантная внеклеточная холестериноксидаза из *Nocardioides simplex* // Биохимия. – 2022. – Т. 87, № 9. – С. 1246-1259.
10. Glass T.L., Saxerud M.H., Casper H.H. Properties of a 4-ene-3-ketosteroid-5 alpha-reductase in cell extracts of the intestinal anaerobe, *Eubacterium* sp. strain 144 // The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. – 1991. – Vol. 39, № 3. – P. 367-374.
11. Lema I., Araújo J.R., Rolhion N., Demignot S. Jejunum: The understudied meeting place of dietary lipids and the microbiota // Biochimie. – 2020. – Vol. 178. – P. 124-136.
12. Holmquist A.J., Auld D.S., Vallee B.L. 3 beta-Hydroxy-5 beta-steroid ehydrogenase activity of human liver alcohol dehydrogenase is specific to gamma-subunits // Biochemistry. – 1988. – Vol. 27, № 12. – P. 4284-4288.
13. Phan C.T., Tso P. Intestinal lipid absorption and transport // Frontiers in Bioscience. – 2001. – Vol. 1, № 6. – P. 299-319.
14. Ryzhavski B.Y., Zadvornaya O.V. 3β -Hydroxysteroid dehydrogenase in ependymocytes in the pavement of the lateral ventricles and villi of the vascular plexus in rats at different ages // Neuropsychology and Behavioral Physiology. – 2013. – Vol. 43, № 7. – P. 860-868.
15. Shen H., Howles P., Tso P. Regulation of intestinal lipid metabolism: current concepts and relevance to disease // Nature Reviews Gastroenterology Hepatology. – 2020. – Vol. 17, № 3. – P. 169-183.
16. Stokes N.A., Hylemon P.B. Characterization of delta 4-3-ketosteroid-5 beta-reductase and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in cell extracts of *Clostridium innocuum* // Biochimica et Biophysica Acta. – 1985. – Vol. 836, № 2. – P. 255-261.
17. Thurnhofer H., Gains N., Mütsch B., Hauser H. Cholesterol oxidase as a structural probe of biological membranes: its application to brush-border membrane // Biochimica et Biophysica Acta. – 1986. – Vol. 856, № 1. – P. 174-181.
18. Tsutsui K., Ukena K., Usui M., Sakamoto H., Takase M. Novel brain function: biosynthesis and actions of neurosteroids in neurons // Neuroscience Research. – 2000. – Vol. 36, № 4. – P. 261-273.
19. Tsutsui K., Sakamoto H., Ukena K. A Novel aspect of the cerebellum: biosynthesis of neurosteroids in the Purkinje cell // Cerebellum. – 2003. – Vol. 2, № 3. – P. 215-222.
20. Wang L., Salavaggione E., Pellemounter L., Eckloff B., Wieben E., Weinshilboum R. Human 3β -hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2: Gene sequence variation and functional genomics // The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. – 2007. – Vol. 107, № 1-2. – P. 88-99.
21. Yandouzi E.H., Zlatkine P., Moll G., Le Grimmellec C. Cholesterol distribution in renal epithelial cells LLC-PK1 as determined by cholesterol oxidase: evidence that glutaraldehyde fixation masks plasma membrane cholesterol pools // Biochemistry. – 1994. – Vol. 33, № 8. – P. 2329-2334.

References

1. Ishutina N.A., Lutsenko M.T., Andrievskaya I.A. The role of cholesterol and estradiol in the development of placental insufficiency in cytomegalovirus infection in the third trimester of gestation // Bulletin of Physiology and Pathology of Respiration. – 2017. – № 65. – P. 54-58.
2. Loyda Z., Gossrau R., Schibler T. Enzyme histochemistry. – M.: Mir, 1982. – 270 p.
3. Lutsenko M.T., Dovzhikova I.V. Hormonal function of the placenta during exacerbation of cytomegalovirus infection during gestation // Bulletin of Physiology and Pathology of Respiration. – 2014. – № 52. – P. 62-67.
4. Oinotkinova O.Sh., Nikonov E.L., Gioeva I.Z. The role of the intestinal microbiota in the pathogenesis of dyslipidemia and associated metabolic disorders // Evidence-based gastroenterology. – 2017. – Vol. 6, № 2. – P. 29-34.
5. Guide to Histology. – SPb.: «SpecLit», 2009. – Vol. 1. – 831 p.
6. Guide to Histology. – SPb.: «SpecLit», 2011. – Vol. 2. – 511 p.
7. Ryzhavsky B.Ya., Litvintseva E.M. Histochemical detection of 3β -hydroxysteroid dehydrogenase in rat brain neurons // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2011. – Vol. 152, № 9. – P. 347-349.
8. Ryzhavsky B.Ya., Zhilnikov D.I. Histochemical analysis of 3β -hydroxysteroid dehydrogenase in rat in neurons of the brain stem in rats // Far Eastern Medical Journal. – 2019. – № 4. – P. 28-31.
9. Fokina V.V., Karpov M.P., Kolerov V.V., Bragin E.Yu., Epictetov D.O., Sviridov A.V., Kazantsev A.V., Shutov A.A., Donova M.V. Recombinant extracellular cholesterol oxidase from *Nocardioides simplex* // Biochemistry. – 2022. – Vol. 87, № 9. – P. 1246-1259.
10. Glass T.L., Saxerud M.H., Casper H.H. Properties of a 4-ene-3-ketosteroid-5 alpha-reductase in cell extracts of the intestinal anaerobe, *Eubacterium* sp. strain 144 // The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. – 1991. – Vol. 39, № 3. – P. 367-374.



11. Lema I., Araújo J.R., Rolhion N., Demignot S. Jejunum: The understudied meeting place of dietary lipids and the microbiota // *Biochimie*. – 2020. – Vol. 178. – P. 124-136.
12. Holmquist A.J., Auld D.S., Vallee B.L. 3 beta-Hydroxy-5 beta-steroid ehydrogenase activity of human liver alcohol dehydrogenase is specific to gamma-subunits // *Biochemistry*. – 1988. – Vol. 27, № 12. – P. 4284-4288.
13. Phan C.T., Tso P. Intestinal lipid absorption and transport // *Frontiers in Bioscience*. – 2001. – Vol. 1, № 6. – P. 299-319.
14. Ryzhavski B.Y., Zadornaya O.V. 3 β -Hydroxysteroid dehydrogenase in ependymocytes in the pavement of the lateral ventricles and villi of the vascular plexus in rats at different ages // *Neuroscience and Behavioral Physiology*. – 2013. – Vol. 43, № 7. – P. 860-868.
15. Shen H., Howles P., Tso P. Regulation of intestinal lipid metabolism: current concepts and relevance to disease // *Nature Reviews Gastroenterology Hepatology*. – 2020. – Vol. 17, № 3. – P. 169-183.
16. Stokes N.A., Hylemon P.B. Characterization of delta 4-3-ketosteroid-5 beta-reductase and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in cell extracts of *Clostridium innocuum* // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1985. – Vol. 836, № 2. – P. 255-261.
17. Thurnhofer H., Gains N., Mütsch B., Hauser H. Cholesterol oxidase as a structural probe of biological membranes: its application to brush-border membrane // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1986. – Vol. 856, № 1. – P. 174-181.
18. Tsutsui K., Ukena K., Usui M., Sakamoto H., Takase M. Novel brain function: biosynthesis and actions of neurosteroids in neurons // *Neuroscience Research*. – 2000. – Vol. 36, № 4. – P. 261-273.
19. Tsutsui K., Sakamoto H., Ukena K. A Novel aspect of the cerebellum: biosynthesis of neurosteroids in the Purkinje cell // *Cerebellum*. – 2003. – Vol. 2, № 3. – P. 215-222.
20. Wang L., Salavaggione E., Pellemounter L., Eckloff B., Wieben E., Weinshilboum R. Human 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2: Gene sequence variation and functional genomics // *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. – 2007. – Vol. 107, № 1-2. – P. 88-99.
21. Yandouzi E.H., Zlatkine P., Moll G., Le Grimellec C. Cholesterol distribution in renal epithelial cells LLC-PK1 as determined by cholesterol oxidase: evidence that glutaraldehyde fixation masks plasma membrane cholesterol pools // *Biochemistry*. – 1994. – Vol. 33, № 8. – P. 2329-2334.

Вклад авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution of the authors: the authors contributed equally to this article.

The authors declare no conflicts of interests.

Статья принята к публикации 10.03.2023.

The article was accepted for publication 10.03.2023.

