

ФІЗІОЛОГІЯ ЛЮДИНИ І ТВАРИН

УДК [616.34:573.4]:546.47

**ВМІСТ СЕКРЕТОРНОГО МАТЕРІАЛУ ТА ЦИНКУ В КЛІТИНАХ ПАНЕТА  
ПРИ ЄУНОІЛЕЇТІ У ЩУРІВ**

**Є. Гороховський\*, Ю. Єщенко, В. Бовт, В. Єщенко**

*Запорізький національний університет  
вул. Жуковського, 66, Запоріжжя 69000, Україна  
e-mail: EgorGorohovski@yandex.ru*

При хімічно індукованому єуноілеїті у щурів спостерігаються однотипні зміни вмісту секреторного матеріалу та цинку в клітинах Панета базальних відділів кишкових крипт тонкого кишечника. Ці зміни залежать від ступеня запального процесу: спостерігається значне зменшення вмісту секреторного матеріалу та цинку при вираженому запаленні тонкого кишечника, індукованого введенням індометацину, та відновлення їхнього вмісту при зменшенні ступеня запального процесу.

*Ключові слова:* єуноілеїт, клітини Панета, секреторний матеріал, цинк.

Роль клітин Панета базальних відділів кишкових крипт до теперішнього часу остаточно не встановлена. Наявність у їхніх секреторних гранулах травних ферментів, на думку деяких дослідників, може свідчити про їхню роль у перетравленні вуглеводів, а наявність іонів важких металів (особливо цинку) — про участь у їх виведенні з організму [7]. Проте найбільш вірогідною здається роль клітин Панета як важливої ланки місцевого неспецифічного імунітету, оскільки їхні секреторні гранули містять значні кількості дефенсинів — катіонних пептидів із широким спектром антимікробної активності [3]. У ряді досліджень показано, що у ссавців дефенсини відіграють ключову роль у забезпеченні антимікробних властивостей гранулоцитів, слизових оболонок, шкіри та інших епітеліальних тканин. Також показано, що продукція β-дефенсинів значною мірою підвищується у відповідь на дію різноманітних стимулів, у тому числі бактерій і прозапальних цитокінів (ІЛ-1β, ІЛ-6, ФНП-α) [2, 9, 11]. Значно менш досліджені взаємовідносини клітин Панета з іншими клітинами імунної системи, хоча останнім часом з'явилися свідчення про наявність між ними двоспрямованого зв'язку. Ці ствердження переважно базуються на тому, що в клітинах Панета щурів відбувається експресія генів, які відповідають за синтез таких речовин, як секреторна фосфоліпаза А<sub>2</sub>, ФНП-α, які є регуляторами запалення, а дефенсини є хемоатрактантами для лейкоцитів, а також індукують експресію прозапальних генів [4, 8, 10, 12]. Зміни вмісту цинку та секреторного матеріалу в клітинах Панета при єуноілеїті у тварин досліджені недостатньо, хоча з огляду на вищевказане можна припустити, що вони відіграють суттєву роль у розвитку запального процесу в тонкому кишечнику.

Метою роботи було дослідити зміни вмісту секреторного матеріалу, який містить дефенсини, та цинку в клітинах Панета при єуноілеїті у щурів. Для досягнення поставленої мети вирішували такі завдання:

- моделювання єуноілеїту у щурів;
- гістологічні дослідження тканини тонкої кишки для оцінки ступеня запального процесу;
- оцінка вмісту цинку та секреторного матеріалу в клітинах Панета;
- статистична обробка отриманих результатів.

### Матеріали та методи

У дослідах були використані нелінійні шури – самці, віком 10–12 міс, вагою  $263 \pm 18$  г. 35 тварин становили дослідну групу, 7 – контрольну. Тварин утримували в умовах віварію, температура повітря становила  $20\text{--}22^\circ\text{C}$ , світловий день – 10 год, доступ до їжі та води – *ad libidum*.

Сюноілеїт викликали шляхом одноразового підшкірного введення тваринам дослідної групи розчину індометацину у дозі  $2,5$  мг/кг [13]. Тварин у кількості 7 особин виводили із досліду на 1, 2, 3, 5 і 7-му добу після введення індометацину.

У тварин брали відрізок термінального відділу клубової кишки,  $2$  см довжиною, який звільняли від вмісту і розрізали на дві частини. Для визначення секреторного матеріалу одну частину кишки фіксували у  $10\%$  розчині формаліну протягом 24 год. Після фіксації тканину ретельно промивали у проточній воді, зневоднювали у спиртах із міцністю, що збільшувалась ( $70^\circ$ ,  $80^\circ$ ,  $90^\circ$ ,  $96^\circ$ , абсолютний спирт – по 6 год у кожному), просвітлювали у ксилолі (дві порції, по 30 хв кожна), просочували у двох порціях рідкого парафіну при  $60^\circ\text{C}$  (по 1,5 год у кожній порції) та заливали в парафінові блоки. З парафінових блоків робили мікротомні зрізи  $6$  мкм завтовшки, які наклеювали на предметні скельця, вкриті хромат-желатиною, депарафінували їх у ксилолі (двічі по 5 хв), доводили до води крізь спирти із міцністю, що знижувалась, і забарвлювали гематоксилін-флоксином.

Для визначення цинку іншу частину кишки фіксували в холодному ( $4^\circ\text{C}$ ) ацетоні протягом 4 год. Фіксовану тканину просвітлювали у ксилолі (дві порції по 2 год у кожній), просочували рідким парафіном при  $60^\circ\text{C}$  та заливали в парафінові блоки, з яких робили зрізи  $10$  мкм завтовшки. Зрізи наклеювали сухим способом на предметні скельця, вкриті яечним альбуміном, і забарвлювали  $0,2\%$  водно-аміаковим розчином дитизону протягом 2 год.

Забарвлені препарати досліджували за допомогою мікроскопа Мікромед-1, оснащеного цифровою камерою UDM-120 при загальному збільшенні  $\times 1000$ . Для аналізу цифрових зображень препаратів тканин кишки використовували програму NIH ImageJ.

Вміст секреторного матеріалу оцінювали кількісним методом, який полягав у підрахунку гранул секреторного матеріалу в цитоплазмі клітин Панета; на основі підрахунку кількості гранул у 100 клітинах розраховували середню їхню кількість у клітині. Інтенсивність цитохімічної реакції дитизону оцінювали напівкількісним методом за трибальною шкалою: за один бал приймали слабопозитивну реакцію, за два – реакцію середньої інтенсивності, за три – інтенсивну реакцію [1]. Середню інтенсивність реакції розраховували на основі аналізу 100 клітин і виражали її в умовних одиницях (ум. од.). Вираженість запального процесу оцінювали за ступенем інфільтрації тканини базальних відділів клубової кишки лейкоцитами на препаратах, забарвлених гематоксилін-флоксином.

Для статистичної обробки результатів досліджень використовували методи описової статистики, порівняння вибірок (непараметричний критерій Колмогорова-Смірнова). Рівень статистичної значущості прийнятий таким, що дорівнює  $0,01$ . Розрахунки проводили за допомогою системи статистичного аналізу даних STATISTICA, версія 6.1.

### Результати і їхнє обговорення

Сюноілеїт різного ступеня важкості був виявлений в усіх тварин на 1–5-ту добу після введення індометацину, що було підтверджено вираженою інфільтрацією тканини кишки лейкоцитами (рис. 1), а також сплюсненням кишкових ворсинок, наявністю ділянок некрозу та виразок слизової оболонки кишки. Особливо ці симптоми були виражені в перші три доби після введення індометацину [5, 6].

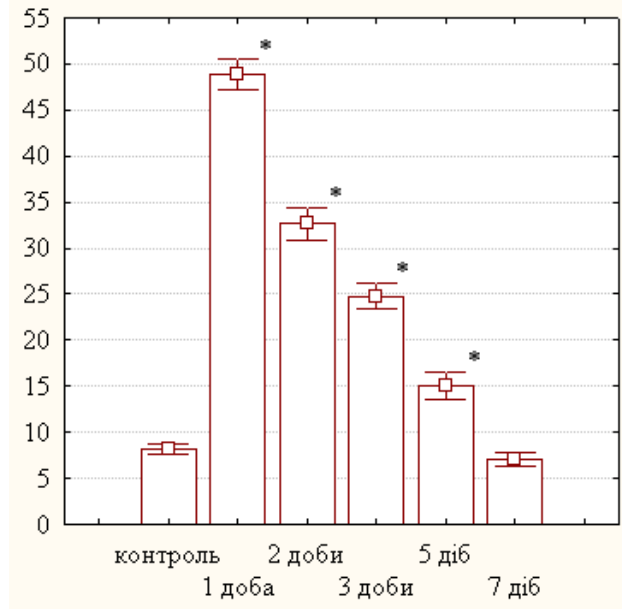


Рис. 1. Кількість лейкоцитів у полі зору (зб. x400) на 1–7-му добу після введення індометацину. (\*  $p < 0,01$ ).

Результати досліджень вмісту секреторного матеріалу та цинку в клітинах Панета щурів із еунолієтом і контрольних тварин наведені на рис. 2 і 3.

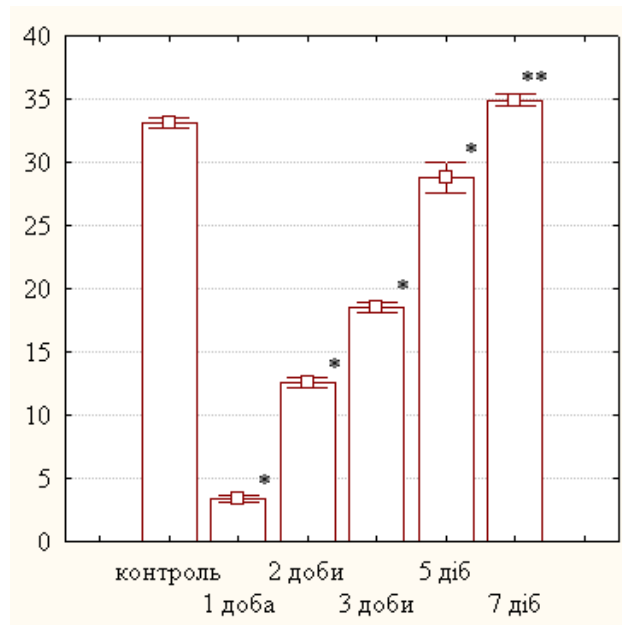


Рис. 2. Кількість гранул секреторного матеріалу в клітинах Панета на 1–7-му добу після введення індометацину (\*  $p < 0,01$ ; \*\*  $p < 0,05$ ).

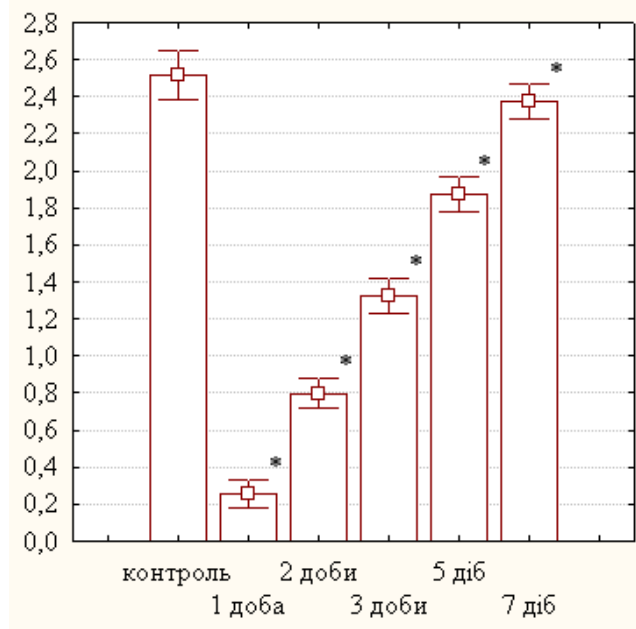


Рис. 3. Інтенсивність реакції дитизону на цинк у клітинах Панета на 1–7-му добу після введення індометацину (\*  $p < 0,01$ ).

Із рис. 2 і 3 видно, що при розвитку гострого запального процесу, який, як відомо з літературних джерел, набуває свого максимуму в перші 24 год після введення індометацину, відбувається суттєва активація секреторної функції клітин Панета, про що свідчить значне зниження в них секреторного матеріалу та цинку. У першу добу вміст секреторного матеріалу та цинку зменшується на 92%, інфільтрація лейкоцитами тканини кишки також значна і перевищує контрольні показники майже в чотири рази. У подальшому спостерігається поступове відновлення вмісту цинку та секреторного матеріалу в клітинах. Важливо зазначити, що цей процес відбувається на фоні зменшення інтенсивності запалення. На сьому добу вміст секреторного матеріалу та цинку в клітинах вже відповідає показникам контрольних тварин, інфільтрація тканини кишки лейкоцитами не спостерігається.

Отже, при єноілеїті у щурів простежується залежність вмісту секреторного матеріалу та цинку в клітинах Панета від ступеня запального процесу. Цей факт можна пояснити таким чином. По-перше, викид великої кількості дефенсинів у ділянках запалення та некрозу запобігає інфікуванню тканини кишки патогенними мікроорганізмами, а також сприяє міграції лейкоцитів до ділянок ураження. По-друге, виділення клітинами Панета секреторної фосфоліпази A2 та ФНП- $\alpha$  може призводити до індукції процесів запалення та регенерації тканини кишки. У свою чергу, виділення лейкоцитами цитокінів може паракринним шляхом стимулювати синтез і секрецію антимікробних пептидів клітинами Панета. У зв'язку з цим видається можливим зробити припущення про важливу роль клітин Панета як важливої ланки місцевої імунної відповіді, дія якої більш складна, ніж проста секреція антимікробних пептидів, але це припущення потребує подальших, більш ретельних, досліджень.

Також треба зауважити, що між змінами вмісту секреторного матеріалу та цинку в клітинах Панета спостерігається виражений зв'язок, що вказує на наявність між ними

функціональних взаємозв'язків, які, ймовірно, полягають у тому, що завдяки цинку в гранулах клітин утворюється депо-форма секреторного матеріалу. Тому можна припустити, що цинк також бере опосередковану участь у процесах запалення в тонкому кишечнику.

Таким чином, спираючись на отримані результати, можна зробити висновки про те, що, по-перше, вміст секреторного матеріалу та цинку в клітинах Панета залежить від ступеня запального процесу в тонкому кишечнику, а по-друге, між цинком і секреторним матеріалом у гранулах клітин Панета наявні функціональні взаємозв'язки.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Соколовский В. В.* Гистохимические исследования в токсикологии. Л.: Медицина, 1971. 176 с.
2. *Ayabe T., Satchell D. P., Wilson C. L. et al.* Secretion of microbicidal  $\alpha$ -defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria // *Nature Immunol.* 2000. Vol. 1. N 2. P. 113–118.
3. *Bevins C. L.* Paneth cell defensins: key effector molecules of innate immunity // *Biochem. Society Transactions.* 2006. Vol. 34. P. 263–266.
4. *Bidgood M. J., Jamal O. S., Cunningham A. M., Brooks P. M.* Type IIA secretory phospholipase A2 up-regulates cyclooxygenase-2 and amplifies cytokine-mediated prostaglandin production in human rheumatoid synoviocytes // *J. Immunol.* 2000. Vol. 165. N 5. P. 2790–2797.
5. *Bouma G., Strober W.* The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease // *Nature Reviews Immunol.* 2003. Vol. 3. N 7. P. 521–533.
6. *Cenac N., Coelho A.-M., Nguyen C., Compton S.* Induction of Intestinal Inflammation in Mouse by Activation of Proteinase-Activated Receptor-2 // *Am. J. Pathol.* 2002. Vol. 161. N 5.
7. *Ergün E., Ergün L., Asti R. N., Kürüm A.* Light and electron microscopic morphology of Paneth cells in the sheep small intestine // *Revue de Médecine Vétérinaire.* 2003. Vol. 154. N 5. P. 351–355.
8. *Lin P. W., Simon P. O., Gewirtz A. T., Neish A. S.* Paneth cell cryptdins act in vitro as apical paracrine regulators of the innate inflammatory response // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. N 19. P. 19902–19907.
9. *Liu A. Y., Destoumieux D., Wong A. V., Park C. H.* Human beta-defensin-2 production in keratinocytes is regulated by interleukin-1, bacteria, and the state of differentiation // *J. Investigative Dermatol.* 2002. Vol. 118. N 2. P. 275–281.
10. *Oppenheim J., Biragyn A., Kwak L., Yang D.* Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity // *Annals of the Rheumatic Diseases.* 2003. Vol. 62. N 2. P. 17–21.
11. *Seong J. S., Seung W. A., Chang K. H., Byung I. R.* Expressions of  $\beta$ -defensins in human keratinocyte cell lines // *J. Dermatological Sci.* 2001. Vol. 27. N 3. P. 183–191.
12. *van Deventer S. J.* Review article: targeting TNF- $\alpha$  as a key cytokine in the inflammatory processes of Crohn's disease – the mechanisms of action of infliximab // *Alimentary Pharmacol. Therapeutics.* 1999. Vol. 13. N 4. P. 3–8.
13. *Yamada T., Deitch E., Specian R. D., Perry M. A.* Mechanisms of acute and chronic intestinal inflammation induced by indomethacin // *Inflammation.* 1993. Vol. 17. N 6. P. 641–662.

Стаття: надійшла до редакції 27.04.11

доопрацьована 21.09.11

прийнята до друку 22.09.11

## ZINC AND SECRETORY MATERIAL CONTENT IN THE PANETH CELLS OF THE RATS WITH JEJUNOILEITIS

**E. Gorohovskiy\*, J. Eshchenko, V. Bovt, V. Eshchenko**

*Zaporizhzhya National University  
66, Zhukovskiy St., Zaporizhzhya 69000, Ukraine  
e-mail: EgorGorohovski@yandex.ru*

Under chemically induced jejunoileitis at rats the same changes of the content of a secretory material and zinc in Paneth cells of basal part of intestinal crypts was observed. These changes depend on degree of inflammation: significant decrease of the content of a secretory material and zinc is observed at the strongly pronounced inflammation of small intestine induced by indometacin administration, and restoration of their contents at decrease of degree of inflammatory process.

*Key words:* jejunoileitis, Paneth cells, secretory material, zinc.

## СОДЕРЖАНИЕ СЕКРЕТОРНОГО МАТЕРИАЛА И ЦИНКА В КЛЕТКАХ ПАНЕТА ПРИ ЕЮНОИЛЕИТЕ У КРЫС

**Е. Гороховский\*, Ю. Єщенко, В. Бовт, В. Єщенко**

*Запорожский национальный университет  
ул. Жуковского, 66, Запорожье 69000, Украина  
e-mail: EgorGorohovski@yandex.ru*

При химически индуцированном еюноилеите у крыс наблюдаются однотипные изменения содержания секреторного материала и цинка в клетках Панета базальных отделов кишечных крипт. Эти изменения зависят от степени воспалительного процесса: наблюдается значительное уменьшение содержания секреторного материала и цинка при выраженном воспалении тонкого кишечника, индуцированном введением индометацина, и восстановление их содержания при уменьшении степени воспалительного процесса.

*Ключевые слова:* еюноилеит, клетки Панета, секреторный материал, цинк.