

РОЗДІЛ 3. ФІЗІОЛОГІЯ ЛЮДИНИ ТА ТВАРИН

УДК [616.34:573.4]:546.47

ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИМІКРОБНОЇ АКТИВНОСТІ КЛІТИН ПАНЕТА IN VIVO

Гороховський Є.Ю., аспірант

Запорізький національний університет

В статті наведені результати дослідження антимікробної активності клітин Панета базальних відділів кишкових крипт. Показано зменшення кількості бактерій в пристінковому слизовому шарі тонкої кишки при активації секреторної функції клітин Панета та збільшення — при пригніченні їх секреторної функції. Також наведені свідчення про те, що на секреторну активність клітин Панета впливають бактеріальні антигени. Таким чином, отриманні данні дозволяють зробити припущення про важливу роль панетівських клітин в місцевому антибактеріальному захисті тонкого кишечника.

Ключові слова: катіонні білки, цинк, клітини Панета, бактерії, тонкий кишечник, слизовий шар

Гороховский Е.Ю. ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК ПАНЕТА IN VIVO / Запорожский национальный университет, Украина.

В статье приведены результаты исследования антимикробной функции клеток Панета базальных отделов кишечных крипт. Показано уменьшение количества бактерий в пристеночном слизистом слое тонкой кишки при активации секреторной функции клеток Панета и увеличение — при угнетении их секреторной функции. Также приведены свидетельства того, что на секреторную активность клеток Панета влияют бактериальные антигены. Таким образом, полученные данные позволяют сделать предположение о важной роли панетовских клеток в местной антибактериальной защите тонкого кишечника.

Ключевые слова: катионные белки, цинк, клетки Панета, бактерии, тонкий кишечник, слизистый слой

Gorohovskiy E.J. INVESTIGATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PANETH CELL IN VIVO / Zaporizhzhya national university, Ukraine.

In paper a findings of investigation of antimicrobial activity of Paneth cells cationic proteins are resulted. Decrease of quantity of bacteria in wall mucosal layer of a small intestine at an activation of secretory function and augmentation - at oppression of secretory function of these cells is shown. Also evidence of influence of bacterial antigens on secretory activity of Paneth cells is shown. Thus, obtained data allow assumption about important role of Paneth cells in host defense of small intestine.

Key words: cationic proteins, zinc, Paneth cell, bacteria, small intestine, mucosal layer

ВСТУП

Роль клітин Панета базальних відділів кишкових крипт до теперішнього часу остаточно не встановлена. Враховуючи те, що вони містять великі кількості важких металів, особливо цинку, припускають, що вони можуть приймати участь у виведенні важких металів з організму. Наявність в них ряду травних ферментів, дозволяє робити припущення про їх участь у перетравленні вуглеводів [1]. Однак, найбільш вірогідною здається роль клітин Панета як важливої ланки місцевого імунітету, оскільки їх секреторні гранули містять значні кількості антибактеріальних поліпептидів — дефенсинів, також відомих як криптдини, які відносяться до групи катіонних білків [2]. До того ж треба зауважити, що ці гранули також містять великі кількості хелатоутворюючого цинку, біологічна роль якого на даний час не встановлена [3].

Антимікробна дія дефенсинів в умовах *in vitro* досліджена добре [4, 5]. Проте залишається відкритим питання, чи обмежується антимікробна дія катіонних білків клітин Панета лише кишковими криптами, для яких дійсно характерна майже повна

відсутність бактерій, або можлива і за їх межами. Також остаточно не встановлено, чи відбувається секреція катіонних білків постійно (тонічно) або пов'язана із специфічною стимуляцією клітин В бактеріальними антигенами. У зв'язку із цим представляє певний інтерес дослідження антимікробної активності цих клітин в умовах *in vivo*.

Мета цієї роботи полягала у дослідженні антимікробної активності клітин Панета в умовах *in vivo*. З огляду на мету дослідження вирішувались наступні проблеми:

- активація та пригнічення секреторної функції клітин Панета із одночасною оцінкою кількості бактерій у внутрішньому та зовнішньому слизовому шарі клубової кишки під час цих станів;
- введення тваринам антибіотиків широкого кола дії для зменшення кількості бактерій у кишечнику та одночасна оцінка вмісту катіонних білків, цинку в клітинах Панета та кількості бактерій у внутрішньому слизовому шарі тонкої кишки.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У дослідженні було використано 65 дорослих щурів вагою 250-300 г. Усі тварини утримувались невеликими групами в клітках, із необмеженим доступом до їжі та води. У першій серії дослідів тварини перед початком досліджень були випадковим чином розподілені на три групи, по 15 особин в кожній. Перша група слугувала контролем. Тваринам другої групи для пригнічення секреторної функції клітин Панета вводили розчин атропіну сульфату в дозі 2 мг/кг шляхом внутривенної ін'єкції. Тваринам третьої групи внутривенно вводили розчин пілокарпіну гідрохлориду в дозі 1 мг/кг для активації секреторної функції клітин Панета. Тварин виводили із дослідів шляхом декапітації через 3 години після введення речовин.

У другій серії дослідів тварини були розподілені на чотири групи, по 5 особин у кожній. Тварини першої групи слугували контролем, тваринам другої групи підшкірно вводили ампіцилін натрію у дозі 6 мг/кг, тваринам третьої групи – левоміцетину сукцинату розчинного в дозі 15 мг/кг, четвертої – доксицикліну (перорально, 2,5 мг/кг). Тварин виводили із дослідів шляхом декапітації через 4 години після введення речовин.

Для цитохімічного визначення катіонних білків у клітинах Панета шматочки термінального відділу клубової кишки фіксували протягом 24 годин у нейтральному формаліні, для визначення цинку — у холодному ацетоні (4 °C) протягом 4 годин та у рідині Карнуа для гістобактеріоскопічного аналізу (30 хвилин).

Тканину після фіксації в формаліні промивали в проточній воді, зневоднювали в серії спиртів із міцністю, що підвищувалась, просвітлювали в ксилолі, просочували рідким парафіном при 60 °C та заливали у парафінові блоки. Тканину фіксовану в ацетоні та рідині Карнуа просвітлювали в ксилолі, просочували парафіном при 60 °C і також заливали в парафінові блоки. З блоків виготовляли мікросомні зрізи (6 мкм завтовшки для цитохімічного визначення цинку та катіонних білків та 2 мкм — для гістобактеріоскопічного аналізу) наклеювали на предметні скельця та забарвлювали: бромфеноловим синім — для цитохімічного визначення катіонних білків, дитизоном — для визначення цинку та азур-еозином за Максимовим — для гістобактеріоскопічного аналізу.

Інтенсивність цитохімічної реакції бромфенолового синього (БФС) та дитизону оцінювали напівкількісним методом за трибальною шкалою: за один бал приймали слабо позитивну реакцію, за два бали — реакцію середньої інтенсивності, за три — виражену інтенсивну реакцію [6]. На основі оцінки інтенсивності реакції в 100 клітинах розраховували середню її інтенсивність, яку виражали в умовних одиницях (ум. од.).

У пристінковому слизовому шарі клубової кишки підраховували кількість бактерій у 100 полях зору при загальному збільшенні мікроскопу $\times 1600$, після чого розраховували середню кількість бактерій в полі зору.

Статистичний аналіз даних проводився методами описової статистики, порівняння виборок (U критерій Мана-Уїтіні). Рівень статистичної значущості відмінностей прийнятий таким, що дорівнює 0,01. Усі розрахунки проводили за допомогою пакету прикладних програм STATISTICA 6.0.

РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

Результати дослідження антибактеріальної активності катіонних білків клітин Панета щурів *in vivo* наведені в таблиці 1.

Таблиця 1 – Вміст катіонних білків, цинку в секреторних гранулах та кількість бактерій у слизовому шарі клубової кишки щурів в контролі та при стимуляції і пригніченні секреторної активності клітин Панета ($\bar{X} \pm s$).

Група тварин	Інтенсивність цитохімічної реакції (ум. од.)		Кількість бактерій в полі зору	
	Бромфенолового синього	Дитизону	Внутрішній слизовий шар	Зовнішній слизовий шар
Контроль	$1,8 \pm 0,11$	$1,5 \pm 0,07$	$4,1 \pm 0,19$	$53,4 \pm 1,84$
Пілокарпін	$1,2 \pm 0,08^*$	$1,0 \pm 0,07^*$	$2,8 \pm 0,14^*$	$55,3 \pm 1,58^\#$
Атропін	$2,8 \pm 0,10^*$	$2,3 \pm 0,07^*$	$5,5 \pm 0,16^*$	$54,6 \pm 2,20^\#$

Примітка: * — $p < 0,01$; # — $p > 0,05$

Інтенсивність цитохімічної реакції БФС в клітинах контрольних тварин дорівнювала $1,8 \pm 0,11$ ум. од., кількість бактерій $4,1 \pm 0,19$ в полі зору. При активації секреторної функції клітин Панета кількість катіонних білків та цинку в них знижувались (інтенсивність реакції бромфенолового синього знижувалась на 47%, дитизону — на 48% відповідно); також у внутрішньому слизовому шарі спостерігалось і зменшення кількості бактерій на 30%. Пригнічення секреторної функції викликало накопичення катіонних білків та цинку в секреторних гранулах клітин Панета (інтенсивність реакції БФС підвищувалось на 47%, дитизону — на 43%), що супроводжувалось збільшенням кількості бактерій в полі зору на 36%.

Як видно із наведених даних, кількість бактерій у зовнішньому слизовому шарі клубової кишки не змінювалась ні при активації, ні при пригніченні секреторної функції клітин Панета.

Ці спостереження можна пояснити наступним чином: стимуляція секреторної функції клітин Панета призводить до викиду катіонних білків (криптинів) та цинку назовні, що викликає зменшення кількості бактерій у внутрішньому слизовому шарі, а пригнічення, навпаки, зменшує кількість катіонних білків у позаклітинному просторі, що призводить до збільшення кількості бактерій.

Ефективна для антибактеріальної дії концентрація дефенсинів, можлива лише у кишкових криптах та у просторі між ворсинками (внутрішньому слизовому шарі). Катіонні білки клітин Панета мало впливають, або навіть зовсім не впливають на мікрофлору зовнішнього слизового шару. Таким чином можна стверджувати, що основна роль клітин Панета все ж полягає саме в захисті розташованих поряд із ними стовбурових клітин.

Для того, щоб з'ясувати чи відбувається секреція катіонних білків клітинами Панета тонично, або ж тільки у відповідь на дію бактеріальних антигенів нами була проведена друга серія досліджень, результати яких наведено у таблиці 2.

Таблиця 2 – Кількість бактерій у внутрішньому слизовому шарі клубової кишки, вміст катіонних білків і цинку в клітинах Панета контрольних тварин, та тих, що отримали антибактеріальні препарати ($\bar{X} \pm s$).

Група тварин	Кількість бактерій в полі зору	Інтенсивність цитохімічної реакції (ум. од.)	
		БФС	Дитизону
Контроль	$4,4 \pm 0,22$	$1,9 \pm 0,11$	$1,6 \pm 0,07$
Ампіцилін	$2,3 \pm 0,23^*$	$2,5 \pm 0,15^*$	$2,2 \pm 0,08^*$
Левоміцетин	$1,9 \pm 0,16^*$	$2,6 \pm 0,11^*$	$2,4 \pm 0,11^*$
Доксициклін	$1,9 \pm 0,20^*$	$2,6 \pm 0,21^*$	$2,5 \pm 0,11^*$

Примітка: * — $p < 0,01$

У контрольних тварин кількість бактерій в пристінковому слизовому шарі дорівнювала $4,4 \pm 0,22$ бактерії в полі зору, інтенсивність цитохімічної реакції БФС на катіонні білки дорівнювала $1,9 \pm 0,11$ ум. од. При введенні антибіотиків спостерігалось зниження кількості бактерій у слизовому шарі майже в два рази та накопичення катіонних білків в клітинах Панета, про що свідчило підвищення інтенсивності цитохімічної реакції БФС та дитизону.

Спираючись на отримані данні про те, що зменшення кількості бактерій у внутрішньому слизовому шарі клубової кишки призводить до накопичення в клітинах Панета катіонних білків та цинку, можна зробити припущення про наявність взаємозв'язку між секреторною активністю цих клітин та кількістю бактерій у внутрішньому слизовому шарі кишки. На нашу думку цей факт підтверджує припущення про те, що секреція катіонних білків клітинами Панета відбувається переважно у відповідь на дію бактеріальних антигенів.

ВИСНОВКИ

1. Антимікробна дія катіонних білків секреторного матеріалу клітин Панета не обмежується лише кишковими криптами, а можлива і у внутрішньому слизовому шарі кишкових ворсинок.
2. На секреторну активність клітин Панета впливають бактеріальні антигени.
3. Однотипні зміни вмісту катіонних білків та цинку в клітинах Панета свідчать про наявність між цими двома компонентами функціонального зв'язку.

ЛІТЕРАТУРА

1. Ergün E. Light and electron microscopic morphology of Paneth cells in the sheep small intestine / E. Ergün, L. Ergün, R.N. Asti [et al] // *Revue de Médecine Vétérinaire*. — 2003. — Vol. 154. — № 5. — P. 351-355.
2. Bevins C. L. Paneth cell defensins: key effector molecules of innate immunity / C. L. Bevins // *Biochemical Society Transactions*. — 2006. — Vol. 34. — P. 263-266.
3. Eshchenko V.A. Histochemical investigation of zinc / V.A. Eshchenko // *Cytology*. — 1978. — Vol. 20, № 8. — P. 927-933.
4. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity / T. Ganz // *Nature Reviews Immunology*. — 2003. — № 3. — P. 710-720.

5. Oppenheim J. Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity / J. Oppenheim, A. Biragyn, L. Kwak [et al] // *Annals of the Rheumatic Diseases*. — 2003. — Vol. 62. — № 2. — P. 17-21.
6. Соколовский В.В. Гистохимические исследования в токсикологии : монография / В.В. Соколовский. — Л. : Медицина, 1971. — 176 с.

УДК 612.13:564.41/47.22 і 599.323.5

ВМІСТ ЦИНКУ В ТИМОЦИТАХ, В-ІНСУЛОЦИТАХ, ГРАНУЛОЦИТАХ КРОВІ ТА КІСТКОВОГО МОЗКУ ТВАРИН ПРИ ДІЇ СТРЕСОВИХ ФАКТОРІВ

Григорова Н.В., к.б.н., доцент

Запорізький національний університет

Досліджувався вплив одноразових і багаторазових фізичного навантаження та іммобілізації на вміст цинку в тимусі, гранулоцитах периферичної крові та кісткового мозку, а також панкреатичних острівцях мишей, шурів і золотистих хом'ячків. Встановлено накопичення металу в клітинах гостро стресованих тварин, його дефіцит – у випадку хронічного стресу. Ці зміни можна віднести до ознак неспецифічного адаптаційного синдрому клітинної системи та вказують на наявність функціональних зв'язків між клітинами імунної системи та інсулярним апаратом.

Ключові слова: В-інсулоцити, гранулоцити крові, іммобілізація, кістковий мозок, тимус, фізичне навантаження

Григорова Н.В. СОДЕРЖАНИЕ ЦИНКА В ТИМОЦИТАХ, В-ИНСУЛОЦИТАХ, ГРАНУЛОЦИТАХ КРОВИ И КОСТНОГО МОЗГА ЖИВОТНЫХ ПРИ ДЕЙСТВИИ СТРЕССОВЫХ ФАКТОРОВ/ Запорожский национальный университет, Украина.

Исследовалось влияние однократных и многократных физической нагрузки и иммобилизации на содержание цинка в тимусе, гранулоцитах периферической крови и костного мозга, а также панкреатических островках мышей, крыс и золотистых хомячков. Установлено накопление металла в клетках остро стрессированных животных, его дефицит – в случае хронического стресса. Эти изменения можно отнести к признакам неспецифического адаптационного синдрома клеточной системы и указывают на наличие функциональных связей между клетками иммунной системы и инсулярным аппаратом.

Ключевые слова: В-инсулоциты, гранулоциты крови, иммобилизация, костный мозг, тимус, физическая нагрузка, цинк

Grigorova N.V. ZINC CONTENT IN THYMOCYTES, B-INSULOCYTES, BLOOD AND BONE MARROW GRANULOCYTES OF ANIMALS UNDER STRESS FACTORS ACTION / Zaporizhzhya National University, Ukraine

The influence of one-fold and many-fold physical load and immobilization on zinc content was investigated in thymus, blood and bone marrow granulocytes and also in pancreatic islets of mice, rats and golden hamsters. Metal accumulation was established in the cells of acute stressed animals and its deficiency – in the cases of chronic stress. These changes of may be referred to signs of nonspecific adaptation syndrome of cell system and indicates the presence functional connections between the cells of immune system and insular apparatus.

Key words: B-insulocytes, blood granulocytes, bone marrow, immobilization, physical load, thymus, zinc

ВСТУП

Цинк належить до найбільш значущих для людини та тварин мікроелементів. Він є кофактором великої групи ферментів, бере участь у білковому та інших видах обміну, тому він потрібний для нормального перебігу багатьох біохімічних процесів [1, 2]. Цей мікроелемент являє собою важливий структурний компонент клітинних мембран, відіграє важливу роль у функції антиоксидантного ферменту супероксиддисмутази [1-