РОЗДІЛ 3. ФІЗІОЛОГІЯ ЛЮДИНИ ТА ТВАРИН

УДК [616.34:573.4]:546.47

ВМІСТ ЦИНКУ ТА СЕКРЕТОРНОГО МАТЕРІАЛУ В КЛІТИНАХ ПАНЕТА ІММОБІЛІЗОВАНИХ ТВАРИН

Гороховський Є.Ю., аспірант, Єщенко Ю.В., к.б.н., доцент,
Григорова Н.В., к.б.н., доцент, Бовт В.Д., д.б.н, професор,
Єщенко В.А., д.мед.н., професор, Карпов А.К., аспірант

Запорізький національний університет

У статті досліджуються зміни вмісту цинку та секреторного матеріалу в клітинах Панета тонкої кишки тварин під впливом гострого та хронічного іммобілізаційного стресу. Для цитохімічного дослідження цинку були використані дитизон та 8-(п-толуолсульфоніламіно)-хінолін, секреторного матеріалу – флоксин.

Ключові слова: стрес, цинк, іммобілізація, 8-ТСХ, дитизон, флоксин, секреторний матеріал, клітини Панета

Гороховский Е.Ю., Ещенко Ю.В., Григорова Н.В., Бовт В.Д., Ещенко В.А., Карпов А.К. СОДЕРЖАНИЕ ЦИНКА И СЕКРЕТОРНОГО МАТЕРИАЛА В КЛЕТКАХ ПАНЕТА ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ЖИВОТНЫХ / Запорожский национальный университет, Украина.

В статье исследуются изменения содержания цинка и секреторного материала в клетках Панета тонкой кишки животных под воздействием острого и хронического иммобилизационного стресса. Для цитохимического исследования цинка были использованы дитизон и 8-(п-толуолсульфониламино)-хинолин, секреторного материала – флоксин.

Ключевые слова: стресс, цинк, иммобилизация, 8-ТСХ, дитизон, флоксин, секреторный материал, клетки Панета

Gorohovsky E.J., Eshchenko J. V., Grigorova N.V., Bovt V.D., Eshchenko V.A., Karpov A.K. THE CONTENTS OF ZINC AND SECRETORY MATERIAL IN THE PANETH CELLS OF IMMOBILIZED ANIMALS / Zaporizhzhya national university, Ukraine.

In article changes of the contents of zinc and secretory material in Paneth cells of intestine of animals under influence of acute and chronic immobilization stress are investigated. For cytochemical investigations of zinc in Paneth have been used dithizone and 8-(p-toluenesulfonilamino)-quinoline, for cytochemical researches of the secretory material in these cells – phloxine.

Key words: stress, zinc, immobilization, 8-TSQ, dithizone, phloxine, secretory material, Paneth cells

ВСТУП

При дії на організм екстремальних факторів у клітинах відбуваються зміни, об'єднані терміном «неспецифічний адаптаційний синдром клітинної системи». Описані деякі ознаки НАСКС: зміни колоїдного стану цитоплазми, підвищення сорбції фарбників, порушення гранулоутворення, вихід речовин із клітини, зміни метаболізму, накопичення в клітинах вільних радикалів [1]. Проте порушення клітинного метаболізму цинку досліджені мало. Цей мікроелемент є необхідною складовою частиною великої кількості металоферментів, бере участь у стабілізації мембран клітин [2, с. 196; 3, с. 57; 4, с. 46]. У деяких видах клітин, наприклад, в ацидофільних ентероцитах базальних відділів кишкових крипт (клітинах Панета) тонкої кишки акумулюється цинк, доступний для цитохімічного визначення [5, с. 927].

Клітини Панета виявлені в багатьох вищих хребетних і розглядаються як клітини з екзокринною функцією. Їх великі секреторні гранули вміщують кислі мукополісахариди, протеїни, лізоцим. У клітинах Панета було також локалізовано

цитоплазматичні тільця (гранули), які містять кислу фосфатазу. У гістологічних препаратах ці клітини, що мають вигляд зрізаних пірамід, ідентифікуються як за їх розташуванням у кишкових криптах, так і за притаманними їм великими секреторними гранулами.

Остаточно функціональне призначення клітин Панета не встановлено. Вважають, що вони відіграють роль у антибактеріальному захисті, оскільки у відповідь на дію бактерій, бактеріальні антигени чи холінергічну стимуляцію клітини Панета вивільняють антимікробний вміст своїх гранул у проміжки крипт, у яких вони локалізовані, захищаючи, таким чином, стовбурові клітини, які беруть участь у поновленні пулу епітеліальних клітин тонкого кишечника. Тому ця секреція, можливо, сприяє слизистому антимікробному шару тонкого кишечника стримувати ріст мікробної флори [6, с. 423].

Оскільки в гранулах клітин Панета окрім великих кількостей цинку були знайдені також іони свинцю, ртуті та заліза, існує думка, що вони також можуть відігравати роль у виведенні іонів важких металів [6, с. 427]. Причому великі кількості цинку, можливо, чинять цитопротекторну дію шляхом конкурентного зв'язування з металотіонеїном [6, с. 425; 7, с. 44].

Хоча гістологічні дослідження клітин Панета в біоптатах тонкого кишечника запропоновано проводити при різних патологічних станах, проте усі ці методи базуються переважно на вивченні морфометричних показників цих клітин [8, с. 587; 9, с. 72].

У цій роботі ми за допомогою цитохімічних реакцій з використанням дифенілтиокарбазону (дитизону) та 8-(п-толуолсульфоніламіно)-хіноліну (8-ТСХ) досліджували вміст цинку в клітинах Панета мишей та щурів, які піддавались дії іммобілізаційного стресу. Для оцінки функціонального стану вищезазначених клітин ми використовували тест, заснований на постановці цитохімічної реакції з використанням флоксину.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктом дослідження слугували миші та щури. Контрольну групу складали 32 тварини (15 мишей та 17 щурів), 30 тварин (14 мишей та 16 щурів) піддавали дії гострої іммобілізації, а 26 тварин (12 мишей та 14 щурів) – дії хронічної іммобілізації.

У гострих дослідах з іммобілізацією тварин прив'язували м'якими пов'язками до станку в положенні на спині. Тривалість кожної іммобілізації складала 6 годин. У хронічних дослідах таку процедуру повторювали на протязі 10 діб. Тварин забивали декапітацією після закінчення терміну іммобілізації в гострому досліді, та через 3 доби після останньої іммобілізації – у хронічному.

Матеріалом досліджень слугували парафінові зрізи клубової кишки вищезазначених видів тварин.

Для цитохімічного виявлення цинку шматочки клубової кишки безпосередньо після аутопсії фіксували холодним (4 ˚С) ацетоном протягом 12 годин. Після фіксації шматочки тканин витримували у двох порціях ксилолу (по 15 хвилин у кожній), у суміші 50% ксилолу та 50% парафіну протягом 60 хвилин при 37 ˚С. Потім шматочки витримували у двох рідких парафінах (по 1,5 години в кожному) при 56 ˚С. Просочені парафіном шматочки заливали в парафінові блоки, які різали на мікротомі.

Зрізи 5–10 мкм завтовшки наклеювали на предметні скельця за допомогою яєчного альбуміну, депарафінували у двох порціях ксилолу (по 3 хвилини в кожній), а потім витримували у двох порціях ацетону (по 3 хвилини).

Для визначення цинку за допомогою дитизону використовували 0,2 водно-аміаковий розчин цього реагенту. Тривалість фарбування зрізів – 3 години. Потім фарбовані зрізи для видалення залишків фарбника промивали двічі по 5 хвилин у дистильованій воді, монтували у гліцерин-желатин та розглядали під мікроскопом. У цитоплазмі клітин Панета спостерігали червоні гранули. Кількість цих гранул слугує показником вмісту цинку в клітинах.

Робочий розчин дитизону готували таким чином. У колбу ємністю 50 мл з притертою скляною пробкою наливали 30 мл дистильованої води і 0,6 мл 25% розчину гідроксиду амонію, додавали 400 мг дитизону. Суміш перемішували на водяній бані при 70 ˚С протягом 10 хвилин, потім фільтрували крізь знезолений фільтр. Отриманий фільтрат являв собою 1% розчин дитизону, тому що на фільтрі залишалась чверть наважки реагенту. 0,2% робочий розчин дитизону отримували шляхом п'ятиразового розведення основного (1%) розчину дистильованою водою.

Для визначення цинку за допомогою 8-ТСХ парафінові зрізи, виготовлені за методикою, аналогічною для дитизонового методу, депарафінували у двох порціях ксилолу та етанолу – по 3 хвилини у кожному. На депарфіновані зрізи наносили декілька крапель 0,01% ацетонового розчину 8-ТСХ. Через 1 хвилину зрізи промивали дистильованою водою протягом 1 – 5 хвилин, монтували в гліцерин і досліджували під люмінесцентним мікроскопом. Для збудження люмінесценції використовували світлофільтр ФС-1, як захисний (окулярний) використовували світлофільтр зі скла ЖС-18. На препаратах у цитоплазмі клітин Панета спостерігали гранули з жовто-зеленим світлом люмінесценції, кількість яких слугує показником вмісту цинку в клітинах.

Визначення секреторного матеріалу клітин Панета проводили за допомогою флоксинового методу. Для проведення флоксинової реакції в забитих тварин брали ділянки клубової кишки, які фіксували протягом 24 годин у нейтральному формаліні при кімнатній температурі. Після фіксації шматочки тканини послідовно витримували в спиртах з підвищенням міцності: 70%, 80%, 90%, 96% та абсолютний етиловий спирт – по 4 години у кожному. Зневоднені таким чином шматочки заливали в парафін за методикою, описаною вище для цитохімічного визначення цинку. Парафінові блоки різали на мікротомі на зрізи завтовшки 5–10 мкм. Зрізи наклеювали за допомогою яєчного альбуміну на предметні скельця, депарафінували у двох порціях ксилолу та спирту – по 3 хвилини в кожному, промивали водопровідною водою впродовж 5 хвилин, фарбували 0,5% розчином флоксину протягом 3 хвилин, обробляли 2 хвилини 5% розчином фосфорно-вольфрамової кислоти, промивали водопровідною водою впродовж 5 хвилин і диференціювали зрізи під мікроскопом за допомогою 85% етилового спирту. Потім зрізи витримували по 1 – 2 хвилини у двох змінах ксилолу та монтували в канадський бальзам.

Під час мікроскопічного аналізу на препаратах у цитоплазмі клітин Панета були виявлені гранули червоного кольору, кількість яких слугує показником вмісту секреторного матеріалу.

Інтенсивність цитохімічних реакцій дитизону, 8-ТСХ та флоксину в клітинах Панета тварин оцінювали напівкількісним методом. Цей метод полягав у визначенні інтенсивності реакції за трибальною системою, запропонованою В.В. Соколовським (1971) та Ф. Хейхоу і Д. Квагліно (1983). За один бал приймали слабкопозитивну, за два бали – помірну, три бали – виражену за інтенсивністю реакцію. На основі підрахунку на 100 клітинах розраховували середню величину інтенсивності реакції. Підраховували похибку (m) та показник вірогідності (P).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

У таблиці 1 представлені дані дослідження інтенсивності цитохімічних реакцій дитизону, 8-ТСХ та флоксину, які свідчать про вміст цинку та секреторного матеріалу в клітинах Панета іммобілізованих мишей.

Таблиця 1 – Інтенсивність цитохімічних реакцій дитизону, 8-ТСХ та флоксину в клітинах Панета іммобілізованих мишей ($\bar{X} \pm m$)

Група тварин	Кількість тварин	Інтенсивність реакції, ум. од.		
		дитизону	8-ТСХ	флоксину
Контроль	15	1,2±0,11	1,1±0,09	1,2±0,08
Одноразова іммобілізація	14	1,7±0,13**	1,5±0,12**	1,6±0,14**
Багаторазова іммобілізація	12	1,0±0,06*	0,8±0,05*	0,9±0,07*

Примітка: * P<0,05; ** P<0,01.

З даних цієї таблиці видно, що інтенсивність цитохімічної реакції дитизону в клітинах Панета мишей складає у тварин контрольної групи (інтактних) у середньому 1,2±0,01 ум. од, інтенсивність цитохімічної реакції 8-ТСХ – 1,1±0,09 ум. од., флоксину – 1,2±0,08 ум. од. Іммобілізація у гострому досліді підвищує інтенсивність цитохімічних реакцій у досліджуваних клітинах порівняно з контролем: дитизону на 42% (P<0,01), 8-ТСХ на 36% (P<0,01), флоксину на 33% (P<0,01). Багаторазова іммобілізація призводила до зменшення інтенсивності цитохімічних реакцій порівняно з контролем: дитизону – на 17% (P<0,05), 8-ТСХ – на 28% (P<0,05), флоксину – на 25% (P<0,05).

У таблиці 2 представлені дані дослідження вмісту цинку та секреторного матеріалу в клітинах Панета іммобілізованих щурів.

Таблиця 2 – Інтенсивність цитохімічних реакцій дитизону, 8-ТСХ та флоксину в клітинах Панета іммобілізованих щурів ($\bar{X} \pm m$)

Група тварин	Кількість тварин	Інтенсивність реакції, ум. од.		
		дитизону	8-ТСХ	флоксину
Контроль	15	1,9±0,15	2,0±0,17	1,7±0,14
Одноразова іммобілізація	14	2,6±0,29*	2,7±0,21*	2,3±0,18*
Багаторазова іммобілізація	12	1,4±0,11*	1,5±0,12*	1,3±0,09*

Примітка: * P<0,05.

Згідно з даними таблиці 2 інтенсивність цитохімічної реакції дитизону в клітинах Панета щурів у тварин контрольної групи складала в середньому 1,9±0,15 ум. од, інтенсивність цитохімічної реакції 8-ТСХ – 2,0±0,17 ум. од., флоксину – 1,7±0,14 ум. од. Під впливом одноразової іммобілізації інтенсивність цитохімічних реакцій у досліджуваних клітинах порівняно з контролем підвищувалася: дитизону – на 36% (P<0,05), 8-ТСХ – на 35% (P<0,05), флоксину – на 35% (P<0,05). Багаторазова іммобілізація призводила до зменшення інтенсивності цитохімічних реакцій порівняно з контролем: дитизону – на 27% (P<0,05), 8-ТСХ – на 25% (P<0,05), флоксину – на 24% (P<0,05).

Виходячи з фізіологічної ролі цинку в регуляції функціональної активності клітин [4, с. 48; 10, с. 409], можна припустити, що факт його акумулювання при гострому стресі є характерною ознакою активізації захисних механізмів клітин, а розвиток дефіциту при хронічному стресі відображає послаблення захисних механізмів клітин.

Підвищення інтенсивності цитохімічної реакції флоксину в клітинах Панета тварин у стані гострого іммобілізаційного стресу вказує на підвищення вмісту секреторного матеріалу в цих клітинах. Зниження інтенсивності флоксинової реакції в досліджуваних клітинах у тварин в стані хронічного іммобілізаційного стресу вказує на дефіцит секреторного матеріалу в клітинах.

При порівнянні даних таблиць 1 і 2 привертає увагу однотипний характер змін вмісту цинку і секреторного матеріалу в клітинах Панета мишей та щурів після іммобілізації. Ця обставина вказує на наявність між цими компонентами клітин функціонального зв'язку і може свідчити про роль цинку в депонуванні секреторного матеріалу в клітинах.

ВИСНОВКИ

1. Гострий іммобілізаційний стрес призводить до збільшення вмісту цинку та секреторного матеріалу в клітинах Панета мишей та щурів, а хронічний, навпаки — до його зменшення.
2. Однотипний характер змін вмісту цинку та секреторного матеріалу в панетовських клітинах тварин, які зазнали дії іммобілізації, дозволяє віднести ці зміни до ознак неспецифічного адаптаційного синдрому клітинної системи.

ЛІТЕРАТУРА

1. Браун А.Д. Неспецифический адаптационный синдром клеточной системы / А.Д. Браун, Т.П. Моженок – Л.: Наука, 1987. – 232 с.
2. Varvara E. Copper-zinc superoxiddismutase activity and inflamed human pulp / E. Varvara, T. Traini, P. Esposito, S. Caputi, E. Perinetti // Int. Endoc. J. – 2005. – Vol. 38, №3. – P. 195–199.
3. Shin S.J. Molecular characterization of a sDNA encoding copper/zinc superoxiddismutase from cultured cells of Manihot Esculenta / S.J. Shin, H.S. Lee, S.T. Kwon, S.S. Kwak // Plant. Physiol. Biochem. – 2005. – Vol. 43, №1. – P. 55-60.
4. Tudor R. Zinc in health and chronic disease / R. Tudor, P.D. Zalevsky, R.N. Ratnoike // J. Nutr. Health. Aging. – 2005. – Vol. 9, №1. – P. 45-51.
5. Ещенко В.А. Гистохимическое исследование цинка / В.А. Ещенко // Цитология. – 1978. – Т. 20, №8. – С. 927-933.
6. Sandow M.J., Whitehead R. Progress report: the Paneth cell / M.J. Sandow, R. Whitehead // Gut. – 1979. Vol. 20, №5. – P. 420-431.
7. Луговський С.П. Вплив мікроелементів заліза та цинку на всмоктування свинцю слизовою оболонкою різних відділів тонкої кишки щурів / С.П. Луговський // Фізіологічний журнал. – 2001. – Т. 47, №2. – С. 41-44.
8. Bohane T.D. Acrodermatitis enteropathica, zinc, and the Paneth cell: a case study report with family studies / T.D. Bohane, E. Cutz, J.R. Hamilton, D.G. Gall // Gastroenterology. – 1977. – Vol. 73, №3. – P. 587-592.
9. Watson P.H. Fibrillary cytoplasmic inclusions in neoplastic Paneth cells / P.H. Watson // Histopathology. – 1990. Vol. 16, №1. – P. 69-74.
10. Prasad A.S. Discovery of human zinc deficiency and studies in an experimental human model / A.S. Prasad // Am. J. Clinic. Nutr. – 1991. – Vol. 53, №2. – P. 403-412.