

Т.В. Берегова, Ю.В. Єщенко, В.Д. Бовт, В.А. Єщенко

## Вміст цинку та секреторного матеріалу в гранулоцитах крові та базальних відділів кишкових крипт при стресі

*Вміст цинку та секреторного матеріалу в гранулоцитах крові та клітинах Панета щурів підвищувався при одноразовому фізичному навантаженні та іммобілізації. Багаторазове фізичне навантаження та іммобілізація викликали, навпаки, зменшення концентрації цих компонентів у клітинах. Позитивна кореляція змін у двох видах клітин вказує на можливий функціональний зв'язок між ними.*

*Ключові слова: гранулоцити крові, іммобілізація, клітини Панета, секреторний матеріал, фізичне навантаження, цинк.*

### ВСТУП

Цинк відіграє дуже важливу роль в організмі: він необхідний для активності більшої частини металоензимів, підтримує інтегральну структуру та функцію біомембран [7–12]. Цитохімічно визначений цинк може бути показником функціонального стану клітин [1, 2]. Наявність цього металу в гранулоцитах крові та базальних відділів кишкових крипт ставить питання про можливість функціонального взаємозв'язку цих клітин. На користь такого положення говорять літературні дані про утворення та секрецію клітинами Панета та гранулоцитами крові (нейтрофілами) антимікробних пептидів (дефенсинів) [5, 6]. Заслуговують також на увагу повідомлення про вплив стресових факторів на згадані клітини [9].

Мета цієї роботи – вивчення функціональних зв'язків між клітинами Панета та гранулоцитами крові, порівняльні дослідження впливу стресових факторів на вміст цинку та секреторного матеріалу в цих клітинах.

### МЕТОДИКА

Досліди було проведено на 74 білих безпородних щурах віком 0,5–1 рік, масою 220–315 г. Гострий стрес викликали одноразовим фізичним навантаженням (ОФН) або іммобілізацією (ОІ), хронічний — багаторазовим фізичним навантаженням (БФН) або іммобілізацією (БІ). При ОФН щурів поміщали в акваріум з температурою води 32 °С, де вони плавали протягом 2 год. У випадках з ОІ тварин прив'язували до станку за допомогою м'яких пов'язок на 6 год. При БФН та БІ такі процедури повторювали щоденно протягом 10 діб. Адреналін вводили підшкірно у дозі 0,05 мг/кг, преднізолон — внутрішньом'язово у дозі 5–10 мг/кг. В окремих дослідах використовували щурів, яким видаляли надниркові залози (адреналектомія).

При проведенні досліджень на щурах керувалися положеннями Європейської конвенції (Страсбург, 1986).

Кров на дослідження брали у щурів з хвоста. Частину мазків фіксували у парах формаліну впродовж 5 хв і забарвлювали дитизоном або метиловим фіолетовим-

флоксинам (МФФ).

Частину мазків одночасно фіксували та обробляли 8-(*p*-толуолсульфоніламіно)-хіноліном (8-ТСХ) — селективним реагентом на цинк.

Робочий розчин дитизону готували п'ятиразовим розбавленням дистильованою водою його основного розчину. Для приготування останнього в колбочку з притертою пробкою наливали 45 мл дистильованої води, 0,9 мл 25%-го розчину гідроокису амонію, 600 мг дитизону. Суміш перемішували на водяній бані (70 °С) протягом 10 хв, пропускали крізь беззольний фільтр. Тривалість забарвлення мазків — 3 год, потім їх промивали дистильованою водою та заливали у гліцерин-желатин. Мазки розглядали під світловим мікроскопом.

Для проведення цитохімічної реакції 8-ТСХ застосовували 0,01%-й ацетоновий розчин барвника. Тривалість забарвлення 5 хв. Потім мазки промивали дистильованою водою (рН 8,0–8,5), заливали у гліцерин та досліджували за допомогою люмінесцентного мікроскопа (світлофільтри ФС-1, ЖС-18).

Секреторний матеріал у гранулоцитах крові визначали забарвленням МФФ. Мазки, фіксовані у парах формаліну, забарвлювали протягом 1 хв 1%-м розчином метилового фіолетового, потім повторно фіксували (30 хв) у парах формаліну, забарвлювали 0,5%-м розчином флоксину (5 хв), промивали дистильованою водою, заливали у гліцерин-желатин і досліджували під світловим мікроскопом.

Для отримання цитохімічних реакцій на цинк у тонкій кишці (клубова), яку фіксували у холодному (4 °С) ацетоні впродовж 12 год, потім послідовно проводили через два ксилоли (по 15 хв у кожному), суміш 50%-го парафіну та 50%-го ксилолу (30 хв при 40 °С), два рідких парафіни (по 1,5 год у кожному при 56 °С) і заливали у парафін.

Зрізи завтовшки 5–10 мкм депарафінували обробкою в двох ксилолах і спиртах

(по 3 хв у кожному), потім забарвлювали робочим розчином дитизону (3 год), розглядали під світловим мікроскопом, або обробляли розчином 8-ТСХ і досліджували за допомогою люмінесцентного мікроскопа.

Для визначення секреторного матеріалу в клітинах Панета використовували забарвлення зрізів гематоксилін-флоксинам. Шматочки клубової кишки фіксували протягом доби нейтральним формаліном, потім проводили через спирти зростаючої міцності (70, 80, 90, 96, 100°) — по 4 год у кожному. Далі проводили, як указано вище, через ксилоли, суміш ксилолу з парафіном, два рідкі парафіни.

Депарафіновані зрізи забарвлювали протягом 5 хв у 1%-му розчині гематоксиліну, промивали дистильованою водою, забарвлювали впродовж 5 хв у 0,5%-му розчині флоксину, витримували 2 хв у 5%-му розчині фосфорно-вольфрамової кислоти, промивали проточною водою впродовж 5 хв до відновлення яскраво червоного забарвлення клітин Панета. Забарвлені зрізи заливали у гліцерин-желатин і розглядали під світловим мікроскопом.

Інтенсивність цитохімічних реакцій оцінювали за трибальною системою, запропонованою Соколовським [3], а також Хейхоу і Квагліно [4].

Математичну обробку результатів дослідження проводили за допомогою програми Statistica 6,0. Для оцінки нормального розподілення результатів був застосований критерій Колмогорова-Смірнова, а для порівняння критерій *t* Стьюдента. Коефіцієнт кореляції Пірсона (*r*) підраховували для оцінки ступеня зв'язку між отриманими результатами.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На препаратах, забарвлених дитизоном, у цитоплазмі клітин Панета та гранулоцитах крові визначали гранули червоного кольору. При проведенні цитохімічної реакції 8-ТСХ у цих клітинах визначали гранули, які

люмінесціювали жовто-зеленим світлом. Обидва типи гранул являють собою гранули цинку. Показано, що інтенсивність цитохімічних реакцій дитизону та 8-ТСХ у клітинах підвищена при гострому стресі, введенні адреналіну та преднізолону. Реакція була послаблена при хронічному стресі та після адrenaлектомії.

Як видно з табл. 1, у контрольних (інтактних) щурів інтенсивність реакції дитизону становила 2,1 ум. од.  $\pm$  0,16 ум. од. у клітинах Панета та 1,2 ум. од  $\pm$  0,10 ум. од. у гранулоцитах крові. Вміст цинку був підвищений при ОФН у клітинах Панета на 23 % (P<0,05) і на 42 % (P<0,001) у гранулоцитах крові, а при ОІ на 29 % (P<0,01) і на 33 % (P<0,05) відповідно. Після ін'єкцій адреналіну він підвищувався на 23 % (P<0,05) та 58 % (P<0,001), та преднізолону – 23 % (P<0,05) та 50 % (P<0,001) відповідно. Отже, гострий стрес, введення адреналіну та преднізолону викликали підвищення концентрації цинку в обох типах клітин.

Як видно з табл. 2 БФН викликала зниження концентрації цинку на 52 % (P<0,001) у клітинах Панета та на 42 % (P<0,001) у гранулоцитах, а БІ – на 48 %

(P<0,001) та 50 % (P<0,001) відповідно. Після адrenaлектомії цей показник знизився на 52 % (P<0,001) та 50 % (P<0,001) відповідно. Отже, хронічний стрес та адrenaлектомія викликали зменшення вмісту цинку в обох видах клітин.

На препаратах, забарвлених МФФ, у цитоплазмі базофілів визначали сині, нейтрофілів – фіолетові, еозинофілів – червоні гранули. При забарвленні гематоксилін-флоксином у цитоплазмі клітин Панета спостерігалися червоні гранули.

У контрольних (інтактних) щурів вміст секреторного матеріалу в клітинах Панета був 1,7 ум.од.  $\pm$  0,14 ум. од., у гранулоцитах крові (нейтрофілах) – 1,0 ум. од.  $\pm$  0,08 ум. од. (табл. 3). При ОФН у клітинах Панета цей показник був збільшений на 35 % (P<0,01), в нейтрофілах крові на 30 % (P<0,01), при ОІ – на 29 % (P<0,05) та 40 % (P<0,001), після введення адреналіну – на 35 % (P<0,01) та 30 % (P<0,01), преднізолону – 29 % (P<0,05) та 30 % (P<0,01) відповідно. Таким чином, гострий стрес, введення адреналіну та преднізолону викликали підвищення вмісту секреторного матеріалу в обох видах клітин.

**Таблиця 1. Інтенсивність цитохімічної реакції дитизону в клітинах Панета та гранулоцитах крові щурів при гострому стресі та введенні адреналіну і преднізолону ( $\bar{X} \pm m$ )**

Показник	Інтенсивність реакції, ум. од.		r
	Клітини Панета	Гранулоцити крові	
Контроль (n=16)	2,1 $\pm$ 0,16	1,2 $\pm$ 0,10	0,57*
Одноразове фізичне навантаження (n=15)	2,6 $\pm$ 0,18*	1,7 $\pm$ 0,14***	0,56*
Одноразова іммобілізація (n=16)	2,7 $\pm$ 0,16**	1,6 $\pm$ 0,13*	0,54*
Введення адреналіну (n=14)	2,6 $\pm$ 0,17*	1,9 $\pm$ 1,14***	0,61**
Введення преднізолону (n=13)	2,6 $\pm$ 0,16*	1,8 $\pm$ 1,15***	0,58*

Примітка. Тут і в табл. 2–4 \* P<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001.

**Таблиця 2. Інтенсивність цитохімічної реакції дитизону в клітинах Панета та гранулоцитах крові щурів при хронічному стресі та адrenaлектомії ( $\bar{X} \pm m$ )**

Показник	Інтенсивність реакції, ум. од.		r
	Клітини Панета	Гранулоцити крові	
Контроль (n=16)	2,1 $\pm$ 0,16	1,2 $\pm$ 0,10	0,57*
Багаторазове фізичне навантаження (n=14)	1,0 $\pm$ 0,09*	0,7 $\pm$ 0,04***	0,65**
Багаторазова іммобілізація (n=17)	1,1 $\pm$ 0,08**	0,6 $\pm$ 0,05*	0,58*
Адrenaлектомія (n=12)	1,0 $\pm$ 0,09*	0,6 $\pm$ 0,04**	0,62**

**Таблиця 3. Інтенсивність цитохімічної реакції гематоксилін-флоксину в клітинах Панета та метилового фіолетового-флоксину в гранулоцитах крові (нейтрофілах) щурів при гострому стресі та введенні адреналіну і преднізолону ( $\bar{X} \pm m$ )**

Показник	Інтенсивність реакції, ум. од.		r
	Клітини Панета	Гранулоцити крові	
Контроль (n=16)	1,7±0,14	1,0±0,08	0,62**
Одноразове фізичне навантаження (n=15)	2,3±0,17**	1,3±0,09**	0,55*
Одноразова іммобілізація (n=16)	2,2±0,15**	1,4±0,10***	0,57*
Введення адреналіну (n=14)	2,3±0,18*	1,3±0,11**	0,55*
Введення преднізолону (n=13)	2,2±0,16*	1,3±1,08**	0,57*

**Таблиця 4. Інтенсивність цитохімічної реакції гематоксилін-флоксину в клітинах Панета та метилового фіолетового-флоксину в гранулоцитах крові (нейтрофілах) щурів при хронічному стресі та адреналектомії ( $\bar{X} \pm m$ )**

Показник	Інтенсивність реакції, ум. од.		r
	Клітини Панета	Гранулоцити крові	
Контроль (n=16)	1,7±0,14	1,0±0,08	0,56*
Багаторазове фізичне навантаження (n=14)	0,9±0,08***	0,6±0,04***	0,64**
Багаторазова іммобілізація (n=17)	1,0±0,07***	0,7±0,05**	0,63**
Адреналектомія (n=12)	0,8±0,07***	0,4±0,03***	0,60**

БФН викликало зниження вмісту секреторного матеріалу в клітинах Панета на 47% ( $P<0,001$ ), нейтрофілах крові – на 40% ( $P<0,001$ ), БІ – на 41% ( $P<0,001$ ) та 30% ( $P<0,01$ ), адреналектомія – 53% ( $P<0,001$ ) та 60% ( $P<0,001$ ) відповідно (табл. 4). Отже, хронічний стрес та адреналектомія спричинювали зниження вмісту секреторного матеріалу в обох видах клітин.

Таким чином, позитивна кореляція у клітинах Панета та гранулоцитах крові дає змогу припустити функціональний зв'язок між ними. Пригнічення їх секреторної активності супроводжується накопиченням цинку та секреторного матеріалу. Навпаки, підвищення секреторної активності клітин викликає зменшення концентрації в них цинку та секрету. Підвищення вмісту двох компонентів у клітинах при гострому стресі пояснюється підсиленням інкреторної функції наднирникових залоз. Послаблення цієї функції призводить до дефіциту цинку та секреторного матеріалу в клітинах.

## ВИСНОВКИ

1. Вміст цинку та секреторного матеріалу

в клітинах Панета та гранулоцитах крові підвищується при гострому стресі, введенні адреналіну та преднізолону.

2. При хронічному стресі та адреналектомії зменшується концентрація цинку та секреторного матеріалу в досліджуваних клітинах.

3. На функціональний зв'язок клітин Панета та гранулоцитів крові вказує позитивна кореляція змін в них вмісту цинку та секреторного матеріалу.

**Т.В. Береговая, Ю.В. Єщенко, В.Д. Бовт, В.А. Єщенко**

## СОДЕРЖАНИЕ ЦИНКА И СЕКРЕТОРНОГО МАТЕРИАЛА В ГРАНУЛОЦИТАХ КРОВИ И БАЗАЛЬНЫХ ОТДЕЛОВ КИШЕЧНЫХ КРИПТ ПРИ СТРЕССЕ

Содержание цинка и секреторного материала в гранулоцитах крови и клетках Панета крыс возрастало при однократной физической нагрузке и иммобилизации. Многократная физическая нагрузка и иммобилизация вызывали, наоборот, уменьшение концентрации этих компонентов в клетках. Позитивная корреляция изменений в двух видах клеток указывает на возможную функциональную связь между ними.

Ключевые слова: гранулоциты крови, иммобилизация, клетки Панета, секреторный материал, физическая нагрузка, цинк.

**T.V. Beregova, Y.V. Eshchenko, V.D. Bovt,  
V.A. Eshchenko**

**ZINC AND THE SECRETORY MATERIAL  
CONTENT IN BLOOD GRANULOCYTES AND  
IN BASAL PARTS OF INTESTINE CRYPTS  
DURING STRESS**

Zinc and the secretory material content in blood granulocytes and the Paneth cells of the rats increased by single physical load and immobilization. On the contrary, multiple physical loads and immobilization decreased the concentration of these components in the cells. Positive correlation of changes in both cell types pointed for possible functional connection between them.

Key words: blood granulocytes, immobilization, Paneth cells, secretory material, physical load, zinc.

*Kyiv National Shevchenko University*

**СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Берегова Т.В., Єщенко Ю.В. Зміни вмісту цинку в клітинах при різному функціональному стані інсулярного апарату підшлункової залози // Вісн. ЗДУ. – 2003. – №1. – С. 11–15.

2. Ещенко В.А. Гистохимическое исследование цинка // Цитология. – 1978. – **20**, №8. – С. 297–933.

3. Соколовский В.В. Гистохимические исследования в токсикологии. – Л.: Медицина, 1971. – 172 с.

4. Хэйхоу Ф., Кваглино Д. Гематологическая цитохимия. – М.: Медицина, 1983. – 320 с.

5. Ayabe T., Satchell D.P., Pesendorfer P., Tanabe H., Wilson C.L. Hagen S.J., Quellette A.J. Activation of Paneth cell  $\delta$ -defensins in mouse small intestine // J. Biol. Chem. – 2002. – **277**, №7. – P. 5219–5228.

6. Quellette A.J., Selstead M.E. Paneth cell defensins // FASEB J. – 1996. – **10**. – P. 1280–1289.

7. Prasad A.S. Discovery of human zinc deficiency: impact on human health // Nutrition. – 2001. – **17**. – P. 685–687.

8. Rink L., Gabriel P. Zinc and the immune system // Proc. Nutr. Soc. – 2000. – **59**. – P. 541–552.

9. Tapiero H., Tew K.D. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins // Biomed. Pharmacother. – 2003. – **57**. – P. 399–411.

10. Vallee B.L., Falchuk K.H. The biochemical basis of zinc physiology // Physiol. Rev. – 1993. – **73**. – P. 79–118.

11. Wellinghausen N., Kirchner H., Rink L. The immunobiology of zinc // Immunol. Today. – 1997. – **18**. – P. 519–521.

12. Soderholm J.D., Perdue M.H. Stress and the gastrointestinal tract. II. Stress and intestinal barrier function // Amer. J. Gastrointestinal Liver Physiol. – 2001. – **280**. – P. G7–G13.

*Київ. нац. ун-т імені Тараса Шевченка  
E-mail: tberegova@univ.kiev.ua*

*Матеріал надійшов до  
редакції 21.01.2010*