

Є.Ю. Гороховський, Ю.В. Єщенко, В.Д. Бовт, В.А. Єщенко, І.Є. Юрчук

Функціональний стан клубової кишки, вміст катіонних білків і цинку в клітинах Панета щурів при введенні лінкоміцину, індометацину та метотрексату

досліджували зв'язок між змінами функціонального стану клубової кишки, складом її мікрофлори та секреторною активністю клітин Панета. Введення лінкоміцину спричиняло зменшення загальної кількості бактерій-симбіонтів і появу представників умовно-патогенної мікрофлори. Відмічалися статистично незначущі зміни швидкості транзиту кишкового вмісту та порушення бар'єрної функції кишкового епітелію. Останній характеризувався наявністю ознак запалення. Введення індометацину та метотрексату призводило до суттєвих змін показників функціонального стану тонкої кишки щурів. Швидкість транзиту кишкового вмісту при введенні індометацину зростала на 30 %, а при введенні метотрексату, навпаки, зменшувалася на 90 %. Здатність адсорбувати вітальний фарбник епітелієм клубової кишки в обох випадках посилювалася на 32 та 51 % відповідно, що свідчить про погіршення його бар'єрної функції. При цьому відбувалися суттєві зміни у складі мікрофлори клубової кишки: зменшення кількості симбіонтної та появу умовно-патогенної мікрофлори, транслокація бактерій до поверхні клітин слизової оболонки, про що можна судити за бактеріологічними посівами зіскрібків слизу та гомогенатів тканини кишки. Було встановлено, що в тварин усіх трьох дослідних груп зменшувався вміст у секреторних гранулах клітин Панета катіонних білків і цинку. Отримані результати можуть свідчити про те, що зміни балансу між симбіонтною та умовно-патогенною мікрофлорою є фактором, який робить суттєвий внесок в ушкодження тканини кишки, а також викликає активацію секреторної функції клітин Панета. Ключові слова: дисбактеріоз, ентерит, катіонні білки, клітини Панета, цинк.

ВСТУП

Дослідження останніх років показали, що клітини Панета – це важлива ланка місцевого неспецифічного імунітету, оскільки їх секреторні гранули містять значну кількість катіонних білків (дефенсинів), які відіграють ключову роль у забезпеченні антимікробних властивостей гранулоцитів та епітеліальних тканин [10, 13, 25]. Продукція дефенсинів значною мірою підвищується у відповідь на дію різноманітних стимулів, у тому числі бактерій і прозапальних цитокінів (інтерлейкінів – ІЛ – ІЛ-1 β , ІЛ-6 і фактора некрозу пухлин α – ФНП- α). Останнім часом також

з'явилися свідчення про наявність двонаправленого зв'язку між клітинами імунної системи та клітинами Панета. Оскільки в останніх окрім α -дефенсинів, які до того ж є хемоатрактантами для лейкоцитів та індукують експресію прозапальних генів, синтезуються такі регулятори запалення, як секреторна фосфоліпаза А2 і ФНП- α [25, 32], а також ціла низка інших біологічно активних молекул, зокрема епідермальний фактор росту, α -1 антитрипсин, простагландини [10, 25, 26]. Це дає змогу зробити припущення про багатофункціональну роль клітин Панета, які можуть не тільки забезпечувати антимікробний захист слизової оболонки, а

ще й впливати на розвиток та функціонування стовбурових клітин тонкої кишки.

Також характерною ознакою клітин Панета є те, що їх секреторні гранули містять велику кількість цинку [2–4, 9], де він бере участь у депонуванні протеїнів. Однак подальша доля цинку, що звільняється у позаклітинний простір з гранул клітин Панета, не встановлена. Варто зауважити, що поза клітинами він може чинити пряму антимікробну дію або виступати сигнальною молекулою, оскільки в деяких працях показана роль цинку як вторинного посередника [37].

У зв'язку із доведеною роллю клітин Панета у антимікробному захисті тонкої кишки актуальною науковою проблемою, на нашу думку, є дослідження їх функціонального стану та стану кишки в цілому, із врахуванням змін складу кишкової мікрофлори. Саме це визначило мету нашої роботи: дослідження функціонального стану клубової кишки та клітин Панета, а також змін мікрофлори кишки при введенні лінкоміцину, індометацину та метотрексату. Для досягнення поставленої мети нами були сформульовані наступні завдання: дослідити рухову та бар'єрну функції тонкої кишки, мікроморфометричні показники кишкового епітелію, вміст катіонних білків і цинку в секреторних гранулах клітин Панета на фоні змін у складі мікрофлори тонкої кишки щурів після введення зазначених вище речовин.

МЕТОДИКА

У дослідженні було використано 56 щурів обох статей віком 3–4 міс, масою 240–260 г. Тварин утримували у стандартних умовах віварію, доступ до води та їжі не обмежували. Перед початком експериментів досліджень тварини були розділені на чотири групи: контрольну та три дослідні, по 14 тварин у кожній. При проведенні досліджень дотримувались усіх правил і норм роботи із лабораторними тваринами [1].

Щури першої контрольної групи отримували антибіотик лінкоміцину гідрохлорид

у дозі 60 мг/кг із питною водою протягом 5 днів [6, 22]. Щури другої групи отримували індометацин у дозі 2,5 мг/кг, підшкірно, третьої групи – метотрексат в дозі 20 мг/кг, внутрішньоочеревинно [21, 36]. Тварин, які отримували лінкоміцин виводили із дослідження через одну на 6-ту добу, а тварин, що отримували індометацин і метотрексат – на 2-гу добу після введення препаратів.

Функціональний стан кишки оцінювали за допомогою трьох показників. По-перше, досліджували швидкість транзиту кишкового вмісту із застосуванням методики, запропонованої Нui-Vin із співавт. [20]. Щурам інтрагастрально вводили 10%-ву суспензію активованого вугілля у 1%-му розчині желатину в об'ємі 1,5 мл. Через 30 хв тварин виводили з дослідження та виміряли дистанцію, яку пройшло активоване вугілля від пілоричного сфінктера шлунка до більш каудального відділу кишки. Отримані результати виражали як відсоткове відношення до загальної довжини тонкої кишки.

По-друге, оцінювали бар'єрну функцію кишкового епітелію за допомогою методу, основанийого на його здатності адсорбувати вітальні фарбники [24]. Щурам під ефірною анестезією робили лапаротомію, виділяли ізольовану кишкову петлю, в яку за допомогою шприца вводили 0,3 мл 2%-го розчину нігрозину. Стан анестезії підтримували протягом 60 хв, після чого тварин виводили з дослідження. Відрізок кишки вивертали та промивали у 6 ммоль/л розчині ацетилцистеїну для повного видалення слизу та зв'язаного із ним фарбника. Відміту тканину висувували при 37 °С, зважували та екстрагували нігрозин за дистильованою водою (3 мл) на водяній бані із температурою 50 °С протягом 15 хв. Отриманий екстракт центрифугували при 3000 об/хв упродовж 10 хв, супернатант фотометрували за допомогою фотоколориметра КФК-3 при довжині хвилі 750 нм у кюветі з довжиною оптичного шляху 1 см проти холостої проби, якою був екстракт незабарвленого відрізка кишки,

отриманий у тих самих умовах. Одночасно проводили калібрувальну пробу (0,002%-й розчин нігрозину). Розрахунок вмісту фарбника в екстракті кишки знаходили за методом пропорцій. Результат вимірювань виражали у мікрограмах екстрагованого нігрозину на грам сухої тканини кишки.

По-третє, досліджували мікрморфометричні показники кишкового епітелію: висоту та ширину кишкових ворсинок, глибину кишкових крипт, наявність морфологічно змінених ворсинок (на основі аналізу 100 ворсинок, що найменше у 10 полях зору несуміжних зрізів), кількість келихоподібних клітин і клітин Панета. Також підраховували кількість лейкоцитів у полі зору мікроскопа.

Для цитохімічного визначення вмісту катіонних білків і цинку в клітинах Панета тканину кишки фіксували у нейтральному формаліні та холодному ацетоні протягом 24 год. Після цього її заливали у парафін за стандартною гістологічною методикою. З блоків робили зрізи 2 мкм завтовшки, депарафінували та забарвлювали бромфеноловим синім для дослідження катіонних білків та дитизоном, цинку. Вміст вказаних речовин визначали за площею забарвлених гранул на цифрових зображеннях препаратів за допомогою програми для аналізу біомедичних зображень ImageJ, версія 1.41.

Для оцінки змін кількісного та якісного складу мікрофлори клубової кишки в щурів брали в асептичних умовах відрізок клубової кишки 5 см завдовжки, відбирали її вміст, який висівали на селективні середовища для визначення видового складу бактерій [5]. Також робили посіви зіскрібків слизу, відібраного з поверхні слизової оболонки кишки за допомогою стерильного предметного скельця [12]. Для визначення бактерій у гомогенатах тканини кишки порожнину кишки промивали стерильним ізотонічним розчином, вивертали назовні та гомогенізували; гомогенати також висівали на селективні середовища [18].

Статистична обробка результатів полягала у використанні методів варіаційної статис-

тики (розрахунок середнього арифметичного, стандартного відхилення) та порівняння груп (U критерій Мана-Уїтні). Усі розрахунки проводили із використанням пакету прикладних програм Statistica 6.1 [7].

РЕЗУЛЬТАТИ

На початку нашого дослідження ми провели оцінку рухової функції тонкої кишки, оскільки відомо, що порушення перистальтики є характерною ознакою дисфункції кишечника, викликану в тому числі дією мікроорганізмів. Так, при кишкових інфекціях швидкість транзиту кишкового вмісту зростає, що на фоні підсилення секреції електролітів сприяє “вимиванню” патогенів із порожнини кишки; з іншого боку, атонія кишки може призводити до більш тривалого контакту мікрофлори зі слизовою оболонкою і бути причиною дисбіотичних розладів.

Було встановлено (табл. 1), що у щурів при введенні лінкоміцину швидкість транзиту кишкового вмісту суттєво не відрізнялася від контролю. Але при введенні індометацину та метотрексату спостерігалися значні зміни цього показника: так, у щурів, яким вводили індометацин він збільшувався на 30%, а у щурів, які отримували метотрексат, навпаки, був значно меншим за показник контрольної групи і становив лише 10 % від норми.

Наступним етапом нашого дослідження була оцінка функціонального стану кишкового бар'єра. За нормальних умов він повинен виконувати взаємовиключні функції (з одного боку, бути проникним для поживних речовин та електролітів, а з іншого, протистояти дії патогенних бактерій, токсинів і харчових алергенів). Ця функція забезпечується завдяки синхронізації низки факторів, а саме швидкому відновленню клітин епітелію, секрецію слизу та деяких антимікробних поліпептидів. При порушенні будь-якої зі згаданих ланок бар'єрна функція кишкового епітелію може порушуватися. Нами було встановлено, що в усіх щурів із трьох

Таблиця 1. Швидкість транзиту кишкового вмісту у щурів контрольної та дослідних груп ($X \pm S_x$; $n = 4$)

Група тварин	Довжина тонкої кишки, см	Міграція активованого вугілля, см	Показник швидкості транзиту кишкового вмісту, %
Контроль	92,5±4,01	44,2±6,47	47,7±5,47
Лінкоміцин	92,0±4,17	45,3±3,75	49,4±6,21
Індометацин	95,5±3,82	61,4±5,00	64,4±4,94*
Метотрексат	91,8±3,55	4,5±0,92	4,9±1,08*

* $P < 0,05$ у порівнянні з контролем.

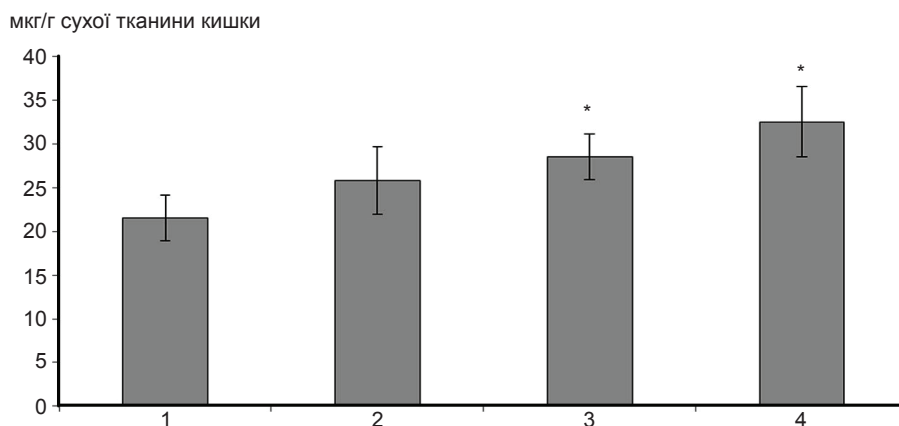
дослідних груп спостерігалось зміни цього показника (рисунок).

Слід відмітити, що у щурів, які отримували лінкоміцин, кількість адсорбованого нігрозину була підвищеною на 20 % у порівнянні з контрольною групою, але ця різниця виявилася статистично незначущою. У щурів при введенні індометацину цей показник був більшим за значення у тварин контрольної групи на 32 %, а при введенні метотрексату на 51 %.

Нормальне здійснення бар'єрної функції кишки є результатом узгодженої дії низки механізмів, в яких головні ролі відіграють тісні контакти ентероцитів, слиз, котрий секретується келихоподібним клітинам та антимікробні пептиди клітин Панета. Тому ми більш ретельно дослідили ступінь ураження слизової оболонки клубової кишки щурів, використавши для цього методи мікроморфометричного аналізу тканини кишки (табл. 2).

У щурів усіх дослідних груп слизова оболонка характеризувалася наявністю ознак

ураження різного ступеня тяжкості. Найменше ці зміни були виражені у щурів при введенні лінкоміцину. Часто зустрічались деформовані ворсинки, але без ерозій та десквамації епітеліальних клітин. Кількість келихоподібних клітин і клітин Панета була збільшеною у порівнянні з контролем (на 45 та 50 % відповідно). Виявлялись ознаки інфільтрація тканини кишки лейкоцитами. У щурів при введенні індометацину ці зміни були виражені більшою мірою: так, на відміну від щурів із дисбактеріозом у ворсинках окрім деформацій, була наявна ерозія їх апікальних відділів, також були виявлені очагові виразкові ураження слизової оболонки. Кількість келихоподібних клітин та клітин Панета не відрізнялася від контрольних значень. Інфільтрація тканини кишки лейкоцитами була більш вираженою. У слизовій оболонці кишки щурів, що отримували метотрексат, був явно виражений набряк власної пластинки кишки, майже всі ворсинки були з ознаками некротичних змін,



Кількість адсорбованого вітального фарбника (нігрозину) в ізольованій кишковій петлі щурів контрольної та дослідних груп ($n = 4$): 1 – контроль, 2 – лінкоміцин, 3 – індометацин, 4 – метотрексат. * $P < 0,05$ у порівнянні з контролем

Таблиця 2. Мікроморфометричні показники та ступінь інфільтрації лейкоцитами епітелію клубової кишки щурів контрольної та дослідних груп ($X \pm S_x$)

Морфометричний показник	Група тварин			
	Контроль (n=5)	Лінкоміцин (n=6)	Індометацин (n=6)	Метотрексат (n=6)
Довжина ворсинок, мкм	320,3±4,82	273,2±14,38**	269,8±20,35**	275,2±6,21**
Ширина ворсинок, мкм	68,9±2,79	88,9±6,31**	94,4±7,6**	105,6±4,25**
Кількість морфологічно змінених ворсинок, %	4,5±1,93	16,5±1,43**	37,3±4,40**	100±0,00**
Середня кількість келихоподібних клітин у ворсинці	12,2±1,78	17,5±2,17**	10,2±4,24	3,7±1,49**
Глибина крипт, мкм	168,1±8,82	128,2±14,38**	183,9±18,54**	185,5±12,23**
Ширина крипт, мкм	41,9±2,74	48,4±7,85*	45,9±3,25	35,7±2,45*
Кількість клітин Панета в крипті	4,6±0,32	6,7±0,27**	4,9±0,24	4,8±0,49
Кількість лейкоцитів в полі зору	9,6±1,70	15,2±3,11**	23,3±1,78**	30,5±2,41**

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ у порівнянні з контролем.

відмічалася масивна десквамація кишкового епітелію. Кількість келихоподібних клітин у ворсинках була зменшеною і становила лише 30 % щодо контролю, кількість клітин Панета не відрізнялась від контролю. Інфільтрація тканини кишки лейкоцитами була максимальною з усіх досліджених груп.

Таким чином, на основі аналізу обраних нами критеріїв оцінки стану кишки можна констатувати, що у тварин усіх дослідних груп спостерігалися певні порушення її функціонального стану, які були найменше вираженими у разі введення лінкоміцину, а найбільше – при введенні метотрексату.

Наступним етапом нашої роботи було дослідження змін мікрофлори клубової кишки. Встановлено, що склад мікрофлори у щурів при введенні лінкоміцину, індометацину та метотрексату суттєво відрізняється від контрольних значень (табл. 3). Також зауважимо, що у одного щура з контрольної групи були ознаки ентериту (набряк кишки, ерозії слизової оболонки), тому він був виключений із дослідження.

У тварин контрольної групи у кишковому вмісті виявлено бактерії чотирьох родин. Найбільше було лактобацил, найменше ентерококів, а кишкова паличка та біфідобактерії займали проміжне положення. На посівах зіскрібків пристінкового слизового шару росту визначалися лактобактерії,

кишкова паличка та дріжджоподібні гриби роду *Candida*. У посівах гомогенатів тканини були наявні лактобацили та гриби роду *Candida*.

На фоні введення лінкоміцину суттєво зменшувалася кількість бактерій у кишковому вмісті: так, для лактобацил цей показник зменшувався у 18333 рази, для біфідобактерій у 31 раз, кишкової палички у 36 разів, а для ентерококу майже не змінювався. Також з'являлися представники алохтонної флори: бактерії родин *Enterobacter* та *Citrobacter*, а також дріжджоподібні гриби роду *Candida*. На посівах зіскрібків слизу та гомогенатах тканини росту мікроорганізмів не відмічалось. При введенні індометацину зміни у складі бактеріальної флори кишкового вмісту були менш виражені: так, кількість лактобацил зменшувалася у 637 разів, біфідобактерій – у 31 раз; збільшилося число кишкової палички у 1,8 раза, а ентерококу у 4,7 раза відповідно. Були виявлені умовно-патогенні бактерії: гемолітична кишкова паличка та бактерії родини *Enterobacter*. У посівах зіскрібків пристінкового слизу були виявлені лактобацили, кількість яких була у 2,1 рази нижчою, ніж у контролі, а також біфідобактерії. Із умовно-патогенної мікрофлори визначалася гемолітична кишкова паличка. У гомогенатах тканини була встановлена наявність лактобацил (у 2 рази менше, ніж у контролі), біфідо-

Таблиця 3. Кількість бактерій у кишковому вмісті, зіскрібках слизу та гомогенаті тканини клубової кишки шурів, log КУО/г ($X \pm S_x$)

Представники бактеріальної флори клубової кишки шурів	Група тварин											
	Контроль (n=5)			Лінкоміцин (n=6)			Індометацин (n=6)			Метотрексат (n=6)		
	Кишковий вміст	Зіскрібок слизу	Гомогенат тканини	Кишковий вміст	Зіскрібок слизу	Гомогенат тканини	Кишковий вміст	Зіскрібок слизу	Гомогенат тканини	Кишковий вміст	Зіскрібок слизу	Гомогенат тканини
Lactobacillus spp.	6,5±0,45	2,1±0,37	2,6±0,37	1,1±0,51**	-	-	3,8±0,16**	1,8±0,16	2,3±0,38	2,8±0,16**	1,5±0,36*	2,3±0,38
Bifidobacterium spp.	2,9±0,16	-	-	1,3±0,38**	-	-	1,3±0,38**	2,2±0,36*	1,5±0,42	2,0±0,39	1,4±0,45	1,4±0,45
Escherichia coli	4,4±0,38	1,9±0,13	-	2,2±0,45**	-	-	4,8±0,16	-	-	6,3±0,45**	2,3±0,45	2,6±0,46
Enterococcus faecalis	1,7±0,43	-	-	1,8±0,16	-	-	2,3±0,38*	-	-	3,3±0,45**	-	-
Staphylococcus epidermidis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,9±0,16	2,3±0,31
E. coli (гемолітична)	-	-	-	-	-	-	5,0±0,64	2,5±0,36	2,6±0,46	2,3±0,38	-	-
Enterobacter gergovie	-	-	-	2,1±0,46	-	-	1,7±0,37	-	-	2,5±0,42	1,9±0,55	1,6±0,33
Citrobacter freundii	-	-	-	2,2±0,42	-	-	-	-	-	-	-	-
Candida albicans	-	1,3±0,38	1,1±0,31	1,8±0,16	-	-	-	-	-	2,0±0,39	1,2±0,36	1,1±0,29

*P<0,05; **P<0,01 у порівнянні з контролем.

бактерій та гемолітичної кишкової палички.

При введенні метотрексату у складі кишкової флори знижувалася кількість лактобацил та біфідобактерій (у 6268 та 31 раз відповідно; кількість кишкової палички та ентерококу навпаки, збільшувалась у порівнянні з контролем (у 105 та 35 разів відповідно). Із умовно-патогенних мікроорганізмів були виявлені *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter gergovie*; а також визначалися дріжджоподібні гриби роду *Candida*. На посівах зіскрібків слизового шару та гомогенатах тканини відмічався ріст типової мікрофлори (лактобацил, біфідобактерій, кишкової палички) та умовно-патогенної (*Staphylococcus epidermidis*, *E. gergovie*) мікрофлори.

Слід відмітити, що погіршення функціонального стану кишки тісно пов'язане зі змінами мікробіоценозів. Причому у разі

введення лінкоміцину саме зміни складу мікрофлори є вірогідною причиною змін функціонального стану кишки, оскільки цей препарат є нетоксичним у дозі, яку отримували шури в нашому дослідженні, тому можна виключити його дію на епітелій кишки [16]. З іншого боку, для індометацину та метотрексату невідомі будь-які ефекти, що безпосередньо впливають на активність бактерій, тобто можна констатувати, що зміни мікрофлори в цих випадках є вторинними, та виникли на фоні змін кишкового епітелію, викликаних введенням цих препаратів.

Клітини Панета є важливою місцевою ланкою антимікробного захисту тонкої кишки, можуть брати участь у регуляції запалення, тому заключним етапом нашого дослідження була оцінка їх функціонального стану за такими показниками, як вміст катіонних білків та цинку (табл. 4).

Таблиця 4. Вміст катіонних білків та цинку в клітинах Панета щурів із дизбактеріозом та ентеритами ($X \pm S_x$)

Група тварин	Площа секреторних гранул, мкм ²	
	Бромфеноловий синій	Дитизон
Контроль (n=5)	79,7±7,47	99,5±3,72
Лінкоміцин (n=6)	58,0±5,75**	80,6±6,85**
Індометацин (n=6)	54,3±4,29**	65,8±5,90**
Метотрексат (n=6)	42,7±1,80**	48,9±2,75**

**P<0,01 у порівнянні з контролем.

У щурів усіх дослідних груп у порівнянні з контрольними тваринами вміст катіонних білків та цинку в клітинах Панета зменшується, що свідчить про значну активацію їх секреторної функції, особливо при тяжкому метотрексатовому ентериті.

ОБГОВОРЕННЯ

Нами було встановлено, що після введення індометацину швидкість транзиту кишкового вмісту зростала, а при введенні метотрексату, навпаки, зменшувалася. Це можна пояснити тим, що будь-які запальні зміни викликають збільшення синтезу простагландинів. При цьому відомо, що простагландини E та I пригнічують рухову функцію кишки, що і спостерігалось при ентериті, викликано-му метотрексатом, який характеризувався найбільш вираженими ознаками запалення [34]. З іншого боку, індометацин – потужний інгібітор їх синтезу, тому його введення може підсилювати рухову функцію ШКТ [17]. Затримку транзиту кишкового вмісту можна віднести до несприятливих факторів при запаленні та дисбактеріозі, оскільки за цих умов відбувається більш тривалий контакт умовно-патогенної флори з поверхнею слизової оболонки. Варто зазначити, що слиз, який вкриває поверхню ШКТ складається з двох шарів: зовнішнього, який легко виділяється, та внутрішнього, міцно прикріпленого до поверхні слизової оболонки. Якщо зовнішній шар слизу в здоровому організмі переважно заселений бактеріями-симбіонтами, то внутрішній – залишається стериль-

ним [23, 28]. При патологічних процесах умовно-патогенна мікрофлора, що синтезує протеолітичні ферменти, здатна призводити до деградації внутрішнього слизового шару та міграції як патогенної, так і симбіонтної мікрофлори безпосередньо до клітин епітелію кишки. Потрапивши до поверхні слизової оболонки патогенні бактерії поглинаються дендритними клітинами або потрапляють у власну пластинку кишки, що призводить до гіперактивації імунної відповіді, та ще більшого ураження тканини кишки під впливом антимікробних поліпептидів нейторофілів, які у значних кількостях мігрують до ділянок ураження. Саме ці явища і спостерігались в нашому дослідженні, особливо у разі введення метотрексату.

Існують певні ефективні механізми адаптації тканини кишки до умов збільшеного тиску умовно-патогенної флори на фоні зменшення кількості бактерій-симбіонтів, які за нормальних умов виконують захисні функції. Так, у щурів при введенні лінкоміцину, на фоні запалення виявлялися добре виражені компенсаторні явища на рівні тканини кишки. До них можна віднести, по-перше, збільшення келихоподібних клітин, та відповідно, гіперсекрецію слизу, який виконує бар'єрну функцію, особливо відносно аеробних бактерій, а по-друге, це збільшення кількості клітин Панета, що повинно призводити до посилення секреції антимікробних пептидів у відповідь на дію бактерій. У щурів, які отримували індометацин та метотрексат, явища компенсації не спостерігались, а ступінь ураження кишки був значно більшим,

з ознаками некрозу тканини. Здійснення компенсаторних явищ на рівні тканини кишки забезпечується збільшенням швидкості оновлення клітин кишкового епітелію, тобто повинна відбуватися активація сигнальних шляхів, які прискорюють проліферацію та диференціацію стовбурових клітин. Однією з таких сигнальних молекул є простагландин E2, який важливий для регуляції росту та диференціації гемопоетичних і мезенхімальних стовбурових клітин [24, 29]. Більше того, нові дані свідчать про те, що простагландин E2 є частиною головного механізму регуляції диференціації загального пулу соматичних стовбурових клітин [15, 19, 31]. Вплив умовно-патогенної мікрофлори індукує процес запалення і, відповідно, збільшення рівня синтезу простагландинів та інших факторів, що скеровують і прискорюють проліферацію та диференціацію клітин кишкового епітелію. Непрямі ознаки прискорення кругообігу клітин кишкового епітелію спостерігались у тварин при введенні лінкоміцину (зменшення глибини кишкових крипт, які є зоною диференціації та росту клітин кишкового епітелію, що свідчить про активну міграцію клітин у напрямку кишкових ворсинок), а при введення індометацину та метотрексату, навпаки, затримувалася проліферація та диференціація.

При введенні індометацину синтез простагландинів пригнічується, тому проліферативна здатність кишкового епітелію може знижуватися. Збільшення глибини кишкових крипт у цьому разі може свідчити про затримку диференціації та міграції клітин у напрямку ворсинок, і відповідно, погіршення репаративних процесів епітелію та зниження його компенсаторних властивостей. Метотрексат є антиметаболітом-антагоністом фолієвої кислоти, в зв'язку із антифолієвими ефектом пригнічує клітинний мітоз, і ріст активно проліферуючих тканин. Тому він блокуючи проліферативну здатність стовбурових клітин кишки, суттєво знижує або зовсім унеможлиблює здатність епітелію до

регенерації, навіть при підвищеному рівні синтезу простагландинів. Результати нашого дослідження свідчать саме про це, оскільки спостерігалось значне зменшення кількості келихоподібних клітин, число клітин Панета не збільшувалося, а також збільшення глибини кишкових крипт.

Зменшення секреції слизу, відсутність компенсаторного збільшення кількості клітин Панета може сприяти активній експансії умовно-патогенної мікрофлори як у слизовий шар, так і у слизову оболонку. Саме на цьому фоні суттєво підсилюється секреторна активність клітин Панета, яке можна пояснити наступним чином. По-перше, викид великої кількості катіонних білків 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- α може призводити до індукції процесів запалення та регенерації тканини кишки; так, наприклад, секреторна фосфоліпаза A2 впливає на активацію циклооксигенази-2 та збільшує цитокінопоередкований синтез простагландинів [11, 24, 26, 35]. У свою чергу, виділення лейкоцитами цитокінів може паракринним шляхом стимулювати синтез і секрецію антимікробних пептидів клітинами Панета.

Відносно подальшої долі цинку, який вивільняється у позаклітинний простір у великих кількостях разом із секреторним матеріалом клітин Панета, не існує загальноприйнятої думки. Але правомірним здається припущення про те, що він може реабсорбуватися, розташованими поряд з клітинами Панета, стовбуровими клітинами кишки, здійснюючи при цьому антиапоптотичну функцію в умовах оксидативного стресу, зумовленого активацією нейтрофілів під час запалення та підвищеного вмісту бактеріальних ліпополісахаридів, що утворюються внаслідок загибелі бактерій [33].

ВИСНОВКИ

1. Рухова функція тонкої кишки щурів при введенні лінкоміцину суттєво не відрізняється від значень у тварин контрольної групи; при введенні індометацину – збільшується, а метотрексату, навпаки, – зменшується.

2. Бар'єрна функція кишкового епітелію та цілісність слизової оболонки кишки у щурів при введенні вищевказаних речовин знижується; на цьому фоні спостерігаються ознаки запалення різного ступеня тяжкості.

3. Кількість бактерій-симбіонтів і комменсалів при введенні лінкоміцину зменшується і з'являються представники умовно-патогенної флори; при ін'єкції індометацину та метотрексату зменшується кількість бактерій симбіонтів, збільшується кількість бактерій комменсалів і спостерігається поява представників умовно-патогенної мікрофлори; також відбуваються міграція симбіонтної і патогенної мікрофлори до поверхні кишкового епітелію.

4. При зазначених вище змінах у складі мікрофлори клубової кишки вміст катіонних білків і цинку в клітинах Панета зменшується, що свідчить про значну активацію їх секреторної функції.

Е.Ю. Гороховский, Ю.В. Ещенко, В.Д. Бовт, В.А. Єщенко, И.Е. Юрчук

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПОДВЗДОШНОЙ КИШКИ, СОДЕРЖАНИЕ КАТИОННЫХ БЕЛКОВ И ЦИНКА В КЛЕТКАХ ПАНЕТА КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ ЛИНКОМИЦИНА, ИНДОМЕТАЦИНА И МЕТОТРЕКСАТА

Исследовали связь между изменениями функционального состояния подвздошной кишки, составом ее микрофлоры и секреторной активностью клеток Панета. Введение линкомицина приводило к уменьшению общего количества бактерий-симбионтов и появлению представителей условно-патогенной микрофлоры. Отмечались статистически незначимые изменения скорости транзита кишечного содержимого и нарушения барьерной функции кишечного эпителия. Последний характеризовался наличием признаков воспаления. Введение индометацина и метотрексата приводило к существенным изменениям

показателей функционального состояния тонкой кишки крыс. Скорость транзита кишечного содержимого при введении индометацина увеличивалась на 30 %, а при введении метотрексата, наоборот, уменьшалась на 90 %. Способность эпителия подвздошной кишки адсорбировать витальный краситель в обоих случаях увеличивалась (на 32 и 51 % соответственно), что свидетельствует о нарушении его барьерной функции. При этом происходили существенные изменения в составе микрофлоры подвздошной кишки: уменьшение количества симбионтной и появление условно-патогенной микрофлоры, транслокация бактерий к поверхности клеток слизистой оболочки, о чем можно судить по бактериологическим посевам соскобов слизи и гомогенатов ткани кишечника. Было установлено, что у животных всех трех экспериментальных групп происходило уменьшение содержания в секреторных гранулах клеток Панета катионных белков и цинка. Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что изменения баланса между симбионтной и условно-патогенной микрофлорой являются фактором, который оказывает существенное влияние на повреждение ткани кишечника, а также вызывает активацию секреторной функции клеток Панета.

Ключевые слова: дисбактериоз, энтерит, катионные белки, клетки Панета, цинк.

Ye.Ju. Horokhovskiy, Ju.V. Eshchenko, V.D. Bovt, V.A. Eshchenko, I.Ye. Yurchuk

FUNCTIONAL STATE OF THE ILEUM, CATIONIC PEPTIDS AND ZINC CONTENT IN THE PANETH CELLS OF THE RATS DOLLING LINCOMYCIN, INDOMETHACIN AND METHOTREXATE ADMINISTRATION

In the paper the relation between the changes of a functional condition of ileum, composition of its microflora and secretory activity of Paneth cells has been investigated. Administration of lincomycin led to a reduction of total of symbiotic bacteria and appearance of opportunistic microflora. Statistically insignificant changes of speed of transit of intestinal contents and damage of barrier function of an intestinal epithelium were noted. The intestinal epithelium was characterized by signs of inflammation. Administration of indomethacin and methotrexate led to significant changes of a functional state of a small intestine of rats. The speed of transit of intestinal contents following indomethacin administration increased by 30 %, and, on the contrary, decreased by 90 % following administration of methotrexate. The ability of epithelium of ileum to adsorb vital dye in both cases increased (by 32 and 51%, respectively) indicating the damage of barrier function. Thus there were significant changes in structure of microflora of ileum: reduction of quantity symbiotic and emergence of opportunistic microflora, a translocation of bacteria to a mucous wall. It was concluded that animal of all three experimental groups had a reduction of the contents of cationic proteins

and zinc in the secretory granules of Paneth cells. These results can testify that balance changes between simbiotic and opportunistic microflora are a factor which has an impact on intestine damage and also causes activation of secretory function of Paneth cells.

Key words: dysbacteriosis, enteritis, cationic proteins, Paneth cells, zinc.

Zaporozhye National University

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Денисов С.Д., Морозкина Т.С. Требования к научному эксперименту с использованием животных // *Здравоохранение*. – 2001. – № 4. – С. 40–42.
- Єщенко Ю.В. Стрес і метаболізм металів. – Запоріжжя: Вид-во Запорізь. нац. ун-ту, 2010. – 258 с.
- Єщенко Ю.В., Єщенко В.А., Бовт В.Д. Вміст цинку, що утворює хелаги, та секреторного матеріалу в гранулоцитах крові та базальних відділів кишкових крипт при стресі // *Фізіол. журн.* – 2010. – **56**, № 5. – С. 40–44.
- Єщенко В.А. Гистохимическое исследование цинка // *Цитология*. – 1978. – **20**, № 8. – С. 927–933.
- Знаменский В.А., Дегтяр Н.В., Кузьминский С.Н. Методические рекомендации. Микробиологическая диагностика дисбактериозов. – К.: Изд-во Киев. гос. ун-та усовершенствования врачей, 1986. – 27 с.
- Пат. № 31012, UA. МПК (2006) A61P31/00. Спосіб моделювання дисбіозу (дисбактеріозу) / Левицький А.П., Селиванська І.О., Цісельський Ю.В., Почтар В.М., Розсоханова Л.М., Гулавський В.Т. – 2008, Бюл. № 6.
- Рєброва О.Ю. Описание процедуры и результатов статистического анализа медицинских данных в научных публикациях. – В кн.: Рекомендации по подготовке научных медицинских публикаций / Под ред. С.Е. Башинского, В.В. Власова. – М.: МедиаСфера, 2006. – С. 94–105
- Ayabe, T., Satchell, D. P., Wilson, C. L., Parks, W. C., Selsted, M. E., Ouellette, A. J. Secretion of microbicidal α -defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria // *Nat. Immunol.* – 2000. – **1**, № 2. – P. 113–118.
- Bevins C. L. Paneth cell defensins: key effector molecules of innate immunity // *Biochem. Soc. Trans.* – 2006. – **34**. – P. 263–266.
- 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. – **165**, № 5. – P. 2790–2797.
- Cohen P.S., Laux D.C. Bacterial adhesion to and penetration of intestinal mucus in vitro // *Methods Enzymol.* – 1995. – № 253. – P. 309–314.
- Ergun E., Ergun L., Asti R.N., Kurum A. Light and electron microscopic morphology of Paneth cells in the sheep small intestine // *Rev. Med. Vet.* – 2003. – **154**, № 5. – P. 351–355.
- Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity // *Nat. Rev. Immunol.* – 2003. – № 3. – P. 710–720.
- Goessling W., North T.E., Loewer S., Lord A.M., Lee S. Genetic interaction of PGE2 and Wnt signaling regulates developmental specification of stem cells and regeneration // *Cell*. – 2009. – № 136. – P. 1136–1147.
- Greenlees K.J., Anadon A. Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. Lincomycin // *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives: (15-20 February 2000, Geneva)*. – Geneva: WHO, 2000. – P. 13–29.
- Gustafsson B.I., Delbro D.S. Effects of indomethacin on non-adrenergic, non-cholinergic motility of stomach and small intestine // *Eur. J. Pharmacol.* – 1988. – 147, № 1. P. 67–72.
- Herias M.V., Midtvedt T., Hanson L.A., Wold A.E. Escherichia coli K5 capsule expression enhances colonization of the large intestine in the gnotobiotic rat // *Infect. Immun.* – 1997. – **65**, №2. – P. 531–536.
- Honda A., Sugimoto Y., Namba T., Watabe A., Irie A. Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP2 subtype // *J. Biol. Chem.* – 1993. – № 268. – P. 7759–7762.
- Beregova T.V., Eshchenko Y.V., Bovt V.D., Eshchenko V.A. Zinc and the Secretory Material Content in Blood Granulocytes and in the Basal Parts of Intestine Crypts during Stress // *Int. J. Physiol. and Pathophysiol.* – 2011. – №3. – P. 211–216.
- Hui-Bin Q., Jin-Yan L., Xin L. Effect of enterokinetic prucalopride on intestinal motility in fast rats // *World J. Gastroenterol.* – 2003. – **9**, № 9. – P. 2065–2067.
- Jahovic N., Sener G., Cevik H., Ersoy Y., Arbak S., Yeğen B.C. Amelioration of methotrexate-induced enteritis by melatonin in rats // *Cell. Biochem. Funct.* – 2004. – **22**, №3. – P. 169–178.
- Jingyun Y., Xinjun H., Xiangcai M., Yu-Ming K. Effects of Portulaca polysaccharide on the dysbacteria in intestinal tract of mice // *FASEB J.* – 2010. – № 24 (Suppl. Abstr. Meeting).
- Johansson M.E., Phillipson M., Petersson J., Velcich A., Holm L., Hansson G.C. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria // *PNAS*. – 2008. – **105**, № 39. – P. 15064–15069.
- Kleiveland C.R., Kassem M., Lea T. Human mesenchymal stem cell proliferation is regulated by PGE2 through differential activation of cAMP-dependent protein kinase isoforms // *Exp Cell Res.* – 2008. – № 314. – P. 1831–1838.
- Lange S., Delbro D.S., Jennische E. Evans blue permeation of intestinal mucosa in the rat // *Scand. J. Gastroenterol.* – 1994. – **29**, № 1. P. 38–46.
- 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. – **279**, № 19. – P. 19902–19907.
- 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. Invest. Dermatol. – 2002. – 118, № 2. – P. 275–281.
28. McGuckin M.A., Lindyn S.K., Sutton P., Florin T.H.. Mucin dynamics and enteric pathogens // Nat. Rev. Microbiology. – 2011. – № 9. – P. – 265–278.
29. North T.E., Goessling W., Walkley C.R., Lengerke C., Kopani K.R. Prostaglandin E2 regulates vertebrate haematopoietic stem cell homeostasis // Nature. – 2007. – № 447. – P. – 1007–1011.
30. Oppenheim J., Biragyn A., Kwak L., Yang D. Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity // Ann. Rheum. Dis. – 2003. – 62, № 2. – P. 17–21.
31. Pinto D., Gregorieff A., Begthel H., Clevers H. Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium // Genes & Development. – 2003. – 17, №14. P.–1709–1713.
32. Seong J.S., Seung W.A., Chang K.H., Byung I.R. Expressions of β -defensins in human keratinocyte cell lines // J. Dermatol. Sci. – 2001. – 27, № 3. – P. 183–191.
33. Thambiayya K., Kaynar A M., Croix C., Pitt B.R. Functional role of intracellular labile zinc in pulmonary endothelium / Pulm. Circ. – 2012. – 2, №4. – P. 442–451.
34. Thor P., Konturek J.W., Konturek S.J., Anderson J.H. Role of prostaglandins in control of intestinal motility // Amer. J. Physiol. – 1985. – 248, № 3 (Pt 1). – P. G353–G359.
35. van Deventer S. J. Review article: targeting TNF- α as a key cytokine in the inflammatory processes of Crohn's disease – the mechanisms of action of infliximab // Aliment. Pharmacol. Ther. – 1999. – 13, № 4. – P. 3–8.
36. Yamada T., Deitch E., Specian R.D., Perry M.A. Mechanisms of acute and chronic intestinal inflammation induced by indomethacin // Inflammation. – 1993. – 17, № 6. – P. 641–662.
37. Yamasaki S., Sakata-Sogawa K., Hasegawa A. Zinc is a novel intracellular second messenger // J. Cell Biol. – 2007. – 177, № 4. – P. 637–645.

Запоріз. нац. ун-т
E-mail: Yehor.horokhovski@gmail.com

Матеріал надійшов
до редакції 24.04.2012