

Повреждающее действие дитизона на гранулоциты крови и базальные отделы кишечных крипт

Ещенко Ю.В.¹, Новицкий В.В.², Бовт В.Д.¹, Ещенко В.А.¹, Уразова О.И.², Григорова Н.В.¹

Dithizone injuring action to blood granulocytes and basal parts of intestine crypts

Yeschenko Yu.V., Novitsky V.V., Bovt V.D., Yeschenko V.A., Urazova O.I., Grigorova N.V.

¹ Запорожский национальный университет, г. Запорожье, Украина

² Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск, Россия

© Ещенко Ю.В., Новицкий В.В., Бовт В.Д. и др.

Показано, что введение дитизона крысам вызывает дефицит цинка в гранулоцитах крови и клетках Панета. Отмечаются фазовые изменения содержания цинка в клетках. Первая фаза (первичного снижения концентрации цитохимически определяемого цинка в клетках) является результатом прижизненного связывания этого металла дитизоном. Вторая фаза (временного частичного повышения содержания цинка в клетках) — результат разложения продукта интравитальной реакции. Третья фаза (вторичного уменьшения концентрации цинка в клетках) связана с некрозом клеток. Введение животным дитизона вызывает также дефицит секреторного материала в клетках.

Ключевые слова: гранулоциты крови, дитизон, клетки Панета, секрет, цинк.

It was shown, that dithizone injection to rats induced zinc deficiency in blood granulocytes and Paneth cells. Phase changes of zinc content were observed in the cells. First phase (primary decrease of cytochemically detected zinc content in the cells) was a result of intravital binding of this metal to dithizone. Second one (permanent partial increase of cell zinc content) was a result of decomposition of the product of intravital reaction. Third phase (secondary decrease of cell zinc concentration) was connected with cell necrosis. Dithizone injection to animals also induced cell secretory material deficiency.

Key words: blood granulocytes, dithizone, Paneth cells, secret, zinc.

УДК 616.155.34:616.34-018.73]-001.37:547.631.7

Введение

Гранулоциты (нейтрофилы) крови и клетки базальных отделов кишечных крипт (клетки Панета) имеют ряд сходных признаков. Известно, что в них вырабатываются антимикробные пептиды (дефенсины) [5, 6]. Нейтрофилы и клетки Панета содержат цитохимически выявляемый цинк [2].

Исследования влияния на данные клетки мощного хелатирующего агента дитизона представляют определенный интерес для гематологов и иммунологов.

Материал и методы

В опытах были использованы беспородные белые крысы в возрасте 0,5—1 года массой тела 200—320 г. Подопытным животным вводили дитизон, контрольным — физиологический раствор.

Для приготовления дитизона в колбу с притертой пробкой наливали 30 мл дистиллированной воды, 0,6 мл 25%-го раствора гидроокиси аммония, высыпали 400 мг дитизона. Смесь перемешивали на водяной бане (70 °С) в течение 10 мин, фильтровали через без-

зольный фильтр. Полученный фильтрат, представляющий собой 1%-й водно-аммиачный раствор дитизона, вводили крысам внутрибрюшинно в дозе 50 мг/кг массы тела (0,5 средней летальной дозы).

Исследования проводили через 30 мин — 5 сут после инъекции дитизона. Животных выводили из эксперимента путем декапитации под эфирным наркозом.

При проведении исследований на крысах руководствовались требованиями Европейской конвенции (Страсбург, 1986), регламентирующей правила обращения с экспериментальными животными.

Кровь для исследований забирали у крыс из хвостовой вены и готовили мазки. Часть мазков фиксировали в течение 5 мин в парах формалина и окрашивали рабочим раствором дитизона, который получали пятикратным разбавлением дистиллированной водой основного раствора, используемого для инъекций. Продолжительность окрашивания составляла 3 ч.

Для проведения цитохимического исследования мазки одновременно фиксировали и окрашивали в течение 1 мин ацетоновым раствором 8-(п-толуолсульфониламино)-хинолина (8-ТСХ).

После декапитации у крыс извлекали кусочки подвздошной кишки, которые использовали для приготовления замороженных срезов толщиной 30—60 мкм, а также для фиксации в холодном (4 °С) ацетоне в течение 12 ч. Фиксированные в ацетоне кусочки кишки дважды (по 15 мин) обрабатывали ксилолом, смесью 50% ксилола и 50% парафина (30 мин) и жидким парафином (дважды по 1,5 ч) и заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 5—10 мкм выдерживали в ксилоле и спирте (дважды по 3 мин в каждом) и окрашивали рабочим раствором дитизона и ацетоновым раствором 8-ТСХ.

Рабочий раствор дитизона, применяемый для окраски срезов кишки, готовили как и при окраске мазков. Продолжительность окраски срезов равнялась 3 ч. Затем срезы промывали в дистиллированной воде, заключали в глицерин-желатин и рассматривали в видимом свете. В светлом поле зрения микроскопа в цитоплазме клеток Панета, как и в гранулоцитах крови, выявляли гранулы красного цвета, которые в темном поле светились оранжево-красным светом.

При постановке 8-ТСХ-реакции депарафинированные срезы обрабатывали в течение 1 мин 0,01%-м

ацетоновым раствором 8-ТСХ, промывали дистиллированной водой (5 мин) и заключали в глицерин. На препаратах в цитоплазме панетовских клеток, как и в гранулоцитах крови, определяли гранулы с желто-зеленой люминесценцией (светофильтры ФС-1, ЖС-18).

Кусочки кишки, фиксированные в нейтральном формалине, обезвоживали в спиртах возрастающей крепости (70, 80, 90, 96, 100°) — по 4 ч в каждом, затем проводили, как указано выше, через ксилол, смесь ксилола с парафином, жидкий парафин и заливали в парафин. Срезы толщиной 5—10 мкм дважды депарафинировали в ксилоле и спирте, промывали дистиллированной водой, окрашивали 0,5%-м раствором флоксина, промывали водой и заключали в глицерин-желатин. На препаратах в цитоплазме панетовских клеток выявляли красные гранулы. Интенсивность цитохимических реакций дитизона, 8-ТСХ и флоксина оценивали по трехбалльной системе, предложенной В.В. Соколовским [3] и Ф. Хэйхоу, Д. Кваглино [4].

Для обнаружения деструктивных изменений в клетках мазки крови окрашивали азур II-эозином, срезы подвздошной кишки — гематоксилин-флоксином [1].

Математическую обработку результатов исследования проводили с помощью программы Statistica 6.0. Для оценки нормальности распределения данных был использован критерий Колмогорова—Смирнова. Для сравнения выборочных данных применяли *t*-критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Введение дитизона крысам вызывало развитие прижизненной реакции с цинком в гранулоцитах крови и клетках Панета. Через 30 мин после инъекции в цитоплазме клеток выявлялись гранулы, которые в светлом поле имели красную окраску, а в темном поле светились оранжево-красным светом. В последующие сроки наблюдался выход продукта цитохимической реакции из гранул. Число гранул в клетках снижалось, окраска цитоплазмы становилась диффузной и через 2 ч не выявлялась. Интенсивность цитохимической реакции с 8-ТСХ и флоксином снижалась.

Эти изменения были сходными во всех типах исследованных клеток, но в клетках Панета они были более выраженными.

В табл. 1 приведены изменения содержания цинка и секреторного материала в клетках Панета через 0,5 ч — 5 сут после введения дитизона.

Таблица 1

Интенсивность цитохимических реакций с 8-ТСХ и флоксином в клетках Панета у крыс в различные сроки после введения дитизона ($X \pm m$)

Сроки после инъекции	Число животных	Интенсивность реакции, усл. ед.	
		8-ТСХ	Флоксин
Контроль	15	2,12 ± 0,15	1,73 ± 0,13
30 мин	12	1,05 ± 0,09**	1,60 ± 0,08
2 ч	14	1,38 ± 0,10**	0,83 ± 0,07**
8 ч	15	0,93 ± 0,06**	0,57 ± 0,05**
1 сут	13	0,84 ± 0,05**	0,42 ± 0,02**
2 сут	10	1,05 ± 0,12**	0,61 ± 0,05**
3 сут	12	1,44 ± 0,11**	0,95 ± 0,09**
5 сут	12	1,70 ± 0,13*	1,32 ± 0,11*

Примечание. p — уровень статистической значимости различий по сравнению с контролем: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,001$.

Из табл. 1 следует, что у контрольных крыс интенсивность цитохимической реакции с 8-ТСХ в клетках составляла (2,12 ± 0,15) усл. ед., а с флоксином — (1,73 ± 0,13) усл. ед. Через 30 мин после введения дитизона содержание цинка в клетках оказалось сниженным на 50% ($p < 0,001$), а секрета — на 8% ($p > 0,05$). Через 2 ч уровень снижения исследованных параметров равнялся соответственно 35% ($p < 0,001$) и 52% ($p < 0,001$), через 8 ч — 56% ($p < 0,001$) и 67% ($p < 0,001$), через 1 сут — 60% ($p < 0,001$) и 76% ($p < 0,001$), через 2 сут — 50% ($p < 0,001$) и 65% ($p < 0,001$), через 3 сут — 32% ($p < 0,001$) и 45% ($p < 0,001$), через 5 сут — 20% ($p < 0,05$) и 24% ($p < 0,05$).

В табл. 2 приведены данные определения числа гранул цинка и секрета в клетках Панета.

Таблица 2

Число гранул цинка и секреторного материала в клетках Панета у крыс в различные сроки после введения дитизона ($X \pm m$)

Сроки после инъекции	Число животных	Число гранул	
		8-ТСХ	Флоксин
Контроль	15	55,82 ± 2,41	57,36 ± 3,54
30 мин	12	22,63 ± 1,25*	48,72 ± 3,05
2 ч	14	36,27 ± 1,83*	46,36 ± 1,76*
8 ч	15	18,53 ± 1,56*	20,61 ± 1,52*
1 сут	13	16,34 ± 1,48*	11,42 ± 1,23*
2 сут	10	23,63 ± 1,35*	23,35 ± 1,35*

3 сут	12	32,14 ± 2,54*	28,79 ± 1,94*
5 сут	12	35,24 ± 2,49*	35,62 ± 2,53*

Примечание. p — уровень статистической значимости различий по сравнению с контролем: * — $p < 0,001$.

Как следует из табл. 2, у контрольных (интактных) крыс число гранул 8-ТСХ составило 55,82 ± 2,41, а флоксина — 57,5 ± 3,54. Через 30 мин после введения дитизона количество гранул 8-ТСХ сокращалось на 59% ($p < 0,001$), а флоксина — на 15% ($p < 0,05$). Через 2 ч количество гранул 8-ТСХ и флоксина оказалось ниже, чем в контроле, соответственно на 37% ($p < 0,001$) и 19% ($p < 0,001$), через 8 ч — на 67% ($p < 0,001$) и 64% ($p < 0,001$), через 1 сут — на 71% ($p < 0,001$) и 80% ($p < 0,001$), через 2 сут — на 58% ($p < 0,001$) и 59% ($p < 0,001$), через 3 сут — на 42% ($p < 0,001$) и 50% ($p < 0,001$), через 5 сут — 37% ($p < 0,001$) и 38% ($p < 0,001$).

Таким образом, введение дитизона вызывало развитие дефицита цинка и секреторного материала в клетках Панета.

На общем фоне дефицита цинка прослеживаются фазные колебания его содержания. Первая фаза (первичного снижения его содержания) наблюдается в течение 1 ч после инъекции дитизона. Ее происхождение можно объяснить развитием интравитальной реакции агента, в результате чего часть цинка в клетках вступает во взаимодействие с дитизоном, поэтому не выявляется при постановке цитохимической реакции с 8-ТСХ. По мере разложения продукта интравитальной реакции количество цитохимически определяемого цинка в клетках нарастает (фаза временного частичного восстановления содержания цинка). Третья фаза (вторичного снижения концентрации цинка в клетках) обусловлена развитием деструктивных изменений в клетках. При этом концентрация секреторного материала в клетках прогрессивно снижалась, а затем несколько повышалась.

Дефицит цинка в клетках Панета сопровождался сходными изменениями в иных клетках иммунной системы, о чем свидетельствует снижение его содержания в гранулоцитах крови.

Заключение

Результаты исследований токсического действия хелатирующего агента дитизона на иммунокомпе-

тентные клетки крови представляют значительный интерес, учитывая широкое распространение и применение хелантов в различных отраслях индустрии, сельском хозяйстве, медицине. Полученные данные вносят определенный вклад в выяснение физиологической [1, 2, 7—10] и иммунобиологической [11] роли цинка.

Литература

1. Авцын А.П., Жаворонков А.А., Риш М.А., Строчкова Л.С. Микроэлементозы человека (этиология, классификация, органопатология). М.: Медицина, 1991. 496 с.
2. Ещенко В.А. Гистохимическое исследование цинка // Цитология. 1978. Т. 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. et al. Activation of Paneth cell α -defensins in mouse small intestine // J. Biol. Chem. 2002. V. 277, № 7. P. 5219—5228.
6. Quелlette A.J., Selstead M.E. Paneth cell defensins // FASEB J. 1996. V. 10. P. 1280—1289.
7. Prasad A.S. Discovery of human zinc deficiency: impact on human health // Nutrition. 2001. V. 17. P. 685—687.
8. Rink L., Gabriel P. Zinc and the immune system // Proc. Nutr. Soc. 2000. V. 59. P. 541—552.
9. Tapiero H., Tew K.D. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins // Biomed. Pharmacother. 2003. V. 57. P. 399—411.
10. Vallee B.L., Falchuk K.H. The biochemical basis of zinc physiology // Physiol. Rev. 1993. V. 73. P. 79—118.
11. Wellinghausen N., Kirchner H., Rink L. The immunobiology of zinc // Immunol. Today. 1997. V. 18. P. 519—521.

Поступила в редакцию 05.01.2010 г.

Утверждена к печати 13.05.2010 г.

Сведения об авторах

Ю.В. Ещенко — канд. биол. наук, доцент Запорожского национального университета (г. Запорожье, Украина).

В.В. Новицкий — заслуженный деятель науки РФ, д-р мед. наук, профессор, академик РАМН, зав. кафедрой патофизиологии СибГМУ (г. Томск, Россия).

В.Д. Бовт — д-р биол. наук, профессор Запорожского национального университета (г. Запорожье, Украина).

В.А. Ещенко — д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой физиологии Запорожского национального университета (г. Запорожье, Украина).

О.И. Уразова — д-р мед. наук, профессор кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск, Россия).

Н.В. Григорова — канд. биол. наук, доцент Запорожского национального университета (г. Запорожье, Украина).

Для корреспонденции

Уразова Ольга Ивановна, тел.: 8-903-913-1483, e-mail: Urazova72@yandex.ru

Уважаемые читатели!

Предлагаем вам подписаться на наш журнал с любого номера

В 2010 году стоимость подписки на полугодие — 1500 рублей, на год — 3000 рублей.

Как оформить подписку на журнал «Бюллетень сибирской медицины»

На почте во всех отделениях связи

Подписной индекс **46319** в каталоге агентства Роспечати «Газеты и журналы 2010, 1-е и 2-е полугодие».

В редакции

• Без почтовых наценок.

• С любого месяца.

• Со своего рабочего места.

По телефону (382-2) 51-41-53; факс (382-2) 51-53-15.

На сайте <http://bulletin.tomsk.ru>

Если вы являетесь автором публикаций или хотите приобрести наш журнал, он будет выслан вам наложенным платежом при заполнении заявки. Стоимость приобретения одного номера 300 рублей.

Заявку на приобретение журнала нужно выслать по адресу редакции:

Ещенко Ю.В., Новицкий В.В., Бовт В.Д. и др.

Повреждающее действие дитизона на гранулоциты крови...

634050, г. Томск, пр. Ленина, 107,
Научно-медицинская библиотека Сибирского государственного медицинского университета,
редакция журнала «Бюллетень сибирской медицины»,
тел. (8-3822) 51-41-53. E-mail: bulletin@bulletin.tomsk.ru