

УДК 616.345-008.1+612.084-015.4

А.І. Афіцька,**Т.В. Довбинчук,****Ю.В. Голота,****Т.М. Червінська,****Г.М. Толстанова**

Навчально-науковий центр "Інститут біології",
Київський національний університет імені Тараса Шевченка

МЕТОД ВИМІРЮВАННЯ ПРОНИКНОСТІ ЕПІТЕЛІЮ ТОВСТОЇ КИШКИ ЩУРІВ У РІЗНІ ТЕРМІНИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО КОЛІТУ

Ключові слова: проникність епітелію, виразковий коліт, товста кишка, методи дослідження епітеліального бар'єру.

Резюме. Було проведено аналіз існуючих методів дослідження бар'єрної функції епітелію товстої кишки при запальних захворюваннях кишечника та адаптовано метод визначення проникності епітелію товстої кишки для щурів лінії Wistar за проникненням фарби Еванс синій із кишечника в кров. Зроблено висновки про більшу чутливість щурів лінії Wistar, порівняно з щурами лінії Sprague-Dawley, до токсичних впливів великих кількостей фарб. Встановлено, що при пероральному введенні рух фарби ЕВ вздовж травного каналу більш повільний у щурів з експериментальним колітом, порівняно з контрольними щурами, тому цей метод є ненадійним для дослідження змін епітеліальної проникності кишечника. Використання 3% концентрації фарби Еванса при пероральному та введенні в ізолювану ділянку кишки, призводить до летальних наслідків в експериментах на щурах лінії Wistar та не може бути рекомендованим до використання. Оптимальними умовами проведення досліджень змін епітеліальної проникності товстої кишки на щурах лінії Wistar є введення в ізолювану ділянку товстої кишки 1,5% фарби ЕВ та визначення її концентрації в зразках плазми крові через 15, 30, 45 та 60 хвилин.

Вступ

Запальні захворювання кишечника (ЗЗК), до яких належать виразковий коліт (ВК) та хвороба Крона (ХК), це тяжкі хронічні запально-деструктивні захворювання нез'ясованої етіології. Вважається, що порушення кишкового бар'єру є одним з етіологічних чинників розвитку ЗЗК. У пацієнтів із ХК та ВК спостерігається послаблення функціонування кишкового епітеліального бар'єру та зміни експресії протеїнів щільних з'єднань, що призводить до збільшення проникності кишечника [9].

Одним із методів прямого визначення проникності епітелію кишечника, що широко використовується, є метод уведення інертної речовини в просвіт кишечника з подальшим вимірюванням її кількості в крові, сечі або стінці кишки. Введення відбувається перорально або в ізолювану ділянку кишки. Для цього використовують ⁵¹Cr-мічений етилендіамінтетраацетат (ЕДТА) [6], поліетиленгліколь (ПЕГ), FITC-декстран [14], Еванс синій (Evans blue, EB) [4].

Застосування EB у подібних експериментах має ряд переваг. У крові EB утворює комплекс із

білком альбуміном (Mг~67 кДа). Комплекс утворюється за рахунок досить сильного зв'язування чотирьох кислих сульфогруп EB з основними групами протеїну [5]. Використання EB дозволяє значно скоротити час досліду, при цьому забезпечуючи точність та достовірність результату [3, 4]. Однак не можна залишати поза увагою той факт, що, як і інші азо-фарби, EB є фіто- та зоотоксичною [10]. Введення EB щурам (45 мгм/кг) призводило до емболії легеневих судин; введення 0,5% чи 1% розчину EB інтравенозно котам та собакам спричиняло нудоту, блювання, діарею та смерть, причому смерть періодично була віддаленою в часі [2]. Зазначається, що летальна доза для щурів вища, ніж для котів та собак. Раніше EB використовували в клініці для визначення об'єму циркулюючої крові, однак від її використання відмовилися внаслідок зростання кількості повідомлень про її токсичний вплив на людський організм [11].

Слід зазначити, що експерименти з визначення епітеліальної проникності з 3% EB проводили на щурах лінії Sprague-Dawley. Цю лінію вивели з лінії Wistar, однак між ними спостерігаються

значні відмінності. Лінія щурів Wistar вважається набагато більш чутливою до стресу, особливо це стосується щурів Wistar Kyoto зі збільшеною експресією рецепторів до кортикотропін-релізинг-фактору. В цілому щурі Wistar Kyoto проявляють про-абсорбтивний фенотип, що може бути пов'язано зі зменшенням холінергічної чутливості епітелію кишечника. Встановлено, що щури лінії Wistar мають більший ступінь проникності епітелію товстої кишки у відповідь на інтерлейкін-6 ніж щури лінії Sprague-Dawley [8]. Також, розмір тимусу у щурів Wistar збільшений у порівнянні з щурами лінії Sprague-Dawley; вважається, що це є компенсаторним механізмом стосовно зниження кількості білих кров'яних клітин у щурів Wistar [1].

Мета дослідження

Зважаючи на токсичність фарби ЕВ, а також фізіологічну відмінність в проникності кишечника щурів лінії Wistar та Sprague-Dawley, метою нашої роботи було адаптувати метод визначення проникності епітелію товстої кишки, застосований для щурів Sprague-Dawley, в експериментах на щурах лінії Wistar.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на білих щурах-самках лінії Wistar масою 170-190 г. Для попередження можливого підвищення проникності епітелію, в результаті соціального стресу "перенаселення клітки", щурів утримували по 3-4 особи за тиждень до початку експерименту. За 24 год до експерименту щурів утримували на голоді з вільним доступом до води.

Йодоацетамід-індукований коліт

Виразковий коліт моделювали ректальним введенням алкілюючого агента йодоацетаміду. Йодоацетамід-викликаний коліт характеризується швидким та чітко визначеним у часі розвитком ознак хвороби (масивний набряк слизової оболонки через 0,5-2 год, інфільтрація лейкоцитів у

стінку товстої кишки через 6 год, пенетрація уражень у підслизовий та м'язовий шари з виникненням некрозу, починаючи з 7-ї доби - проліферація сполучнотканинних клітин, формування грануляційної тканини).

Дослідній групі вводили 0,1 мл 6%-го розчину йодоацетаміду (ІА) в 1%-му розчині метилцелюлози (МС), контрольній групі щурів вводили 0,1 мл 1%-го розчину МС [12]. Введення проводили ректально за допомогою гумового катетера Nelaton S-8 (Rusch, Germany) на відстань 7 см від анального отвору.

Визначення проникності епітеліального бар'єра

Для визначення проникності епітеліального бар'єру вводили фарбу Еванса (ЕВ) у травний тракт щура (перорально або в ізолювану ділянку кишки), через деякий час після цього відбирали кров у пластикові мікропробірки з гепарином. Кров центрифугували впродовж 20 хв (3,000 rpm, T=4°C). Відбирали надосадову рідину, вимірювали її оптичну густину на спектрофотометрі при довжині хвилі 620 та 740 нм. Для корекції вимірювань, з точки зору можливої контамінації зразка пігментами заліза, що утворюються при гемолізі, використовували наступну формулу: Вміст ЕВ у зразку = показник при 620 нм - (1,426 x (показник при 740 нм) + 0,03).

Пероральне введення фарби

ЕВ вводили перорально за допомогою гумового катетера, з розрахунку 18 мл/кг. Кров отримували кардіопунктурою після аутопсії шляхом цервікальної дислокації. Після цього вирізали кишечник та оцінювали відстань, що пройшла фарба після введення в шлунок. Розподіл на групи наведений у табл.1.

Введення фарби в ізолювану ділянку кишечника

МС/ІА вводили ректально, уретан - інтраперитонеально, з розрахунку 110мг/100 г щура. Виконували лапаротомію, накладали лігатури на

Таблиця 1

Групи дослідних тварин, яким перорально вводили фарбу ЕВ

№ групи,	Кількість щурів (n)	Час, год				
		-5	-3,5	-2,5	-2	0
		ЕВ, %	ЕВ, %	Введення МС/ІА	ЕВ, % + МС/ІА	Аутопсія
1	2				1,5 + МС	+
2	2				1,5 + ІА	+
3	1		1,5	МС		+
4	1		1,5	ІА		+
5	1		3	ІА		+
6	1	1,5		МС		+
7	2	1,5		ІА		+

товстий кишечник (біля ілеоцекальної заслінки та в дистальній частині), вводили розчин ЕВ в ізолювану ділянку кишечника. Вводили катетер у яремну вену для забору крові. Після відбору 200 мкл крові у вену вводили аналогічний об'єм фізрозчину. Після аутопсії видаляли ізолювану ділянку кишки та вимірювали її довжину. Кінцеві результати представлені у вигляді ум.од.фарби/см кишки. Розподіл на групи наведений у табл. 2.

Обговорення результатів дослідження

У результаті досліджень із пероральним введенням фарби ЕВ показало, що:

Група 1. 1,5% фарба Еванса, перорально введена контрольній групі (МС) за 2 години, дійшла до ілеоцекальної заслінки, тобто час від моменту введення фарби до аутопсії недостатній для коректного проведення дослідження. Розрахунок кількості ЕВ в плазмі крові показав нульові дані, тобто проникності в кишечник немає.

Таблиця 2

Групи дослідних тварин, яким фарбу ЕВ вводили в ізолювану ділянку товстої кишки

№ групи	Кількість щурів (n)	Час, хв								
		-120	-15	0	15	30	45	60	90	95
		Введення МС/ІА	Уреган	ЕВ, %	Забір крові					Аутопсія
8	2	МС	+	3		+		+	+	+
9	2	ІА	+	3		+		+	+	+
10	3	МС	+	1,5	+	+	+	+		+
11	4	ІА	+	1,5	+	+	+	+		+

Група 2. У групі, якій вводили ІА, 1,5% фарба за 2 години не дійшла 5 см до ілеоцекальної заслінки (тобто в щурів із експериментальним колітом фарба пройшла меншу відстань, ніж у контрольних щурів). Скоріш за все, це свідчить про погіршення моторики кишечника за умов розвитку експериментального коліту, що узгоджується з даними Охата та співав. (2007) [7], які показали зменшення активності гладком'язових клітин при розвитку запальних захворювань кишечника, що призводить до послаблення моторики кишечника (табл. 3).

Група 3. При пероральному введенні 1,5% ЕВ за 3,5 години заповнила сліпу кишку у контрольній групі. Проникності фарби у кров не спостерігалось.

Група 4. У ІА групи 1,5% фарба дійшла до ілеоцекальної заслінки. Проникність більша за контрольне значення (табл. 3).

Група 5. Пероральне введення 3%-го розчину ЕВ за 3,5 години до аутопсії на фоні розвитку ек-

периментального коліту спричинило значне погіршення стану щура (сильне посиніння ділянок шкіри, очей, тахікардію, нудоту та блювання), що призвело до передчасної смерті тварини. Нами було зроблено висновок, що збільшення проникності кишечника, зумовлене розвитком коліту, призвело до проникнення в кров такої кількості фарби, яка виявилась летальною. Тому було вирішено не використовувати 3%-й розчин ЕВ для перорального введення.

Група 6. 1,5% Фарба дійшла до анального отвору. Проникності немає.

Група 7. Фарба пройшла 2,5 та 6,5 см від сліпої кишки у щурів 1 та 2, відповідно. Проникність у першого щура - на рівні контрольних значень, у другого - більша за контроль.

Таким чином, визначення проникності кишечника після перорального введення фарби ЕВ є ненадійним методом, адже ми спостерігали високу варіативність у межах однієї групи значень відстані проходження фарби вздовж травного каналу.

Таблиця 3

Зміни значень проникності епітелію при введенні діючих речовин (ІА/МС) та фарби ЕВ (1,5%) в різні часові проміжки

Група №	Кількість тварин у групі, n	Значення проникності, ум. од.	Час між введенням ІА/МС та ЕВ, год
1	2	-0,22	2
2	2	0,03	
3	1	-0,04	2,5
4	1	0,11	
6	1	-0,05	2,5
7	2	0,07	

Крім того, у тварин із експериментальним колітом швидкість руху фарби була уповільнена у порівнянні з контрольними тваринами, що унеможливило порівняння результатів.

Зважаючи на вищенаведене, ми перевірили надійність та відтворюваність методики ізольованої ділянки кишки для визначення епітеліальної проникності кишечника. Зміни способу введення фарби ЕВ призвели до покращення отриманих результатів.

Група 8. Введення 3% фарби ЕВ в ізольовану ділянку кишки призвело до значної проникності

епітелію кишечника контрольної групи тварин (рис. 1).

Група 9. Ведення 3% ЕВ ІА групі тварин призвело до смерті обох щурів незадовго до другого відбору крові. Значення проникності набагато менші, ніж у контрольної групи (рис.1, табл.2). Скоріш за все, це пов'язано з масовим проникненням альбуміну крові в стінку товстої кишки, викликаним розвитком експериментального коліту, та занадто великою концентрацією фарби в ізольованій ділянці кишечника (рис. 1).

У зв'язку з доведеною токсичністю 3% ЕВ

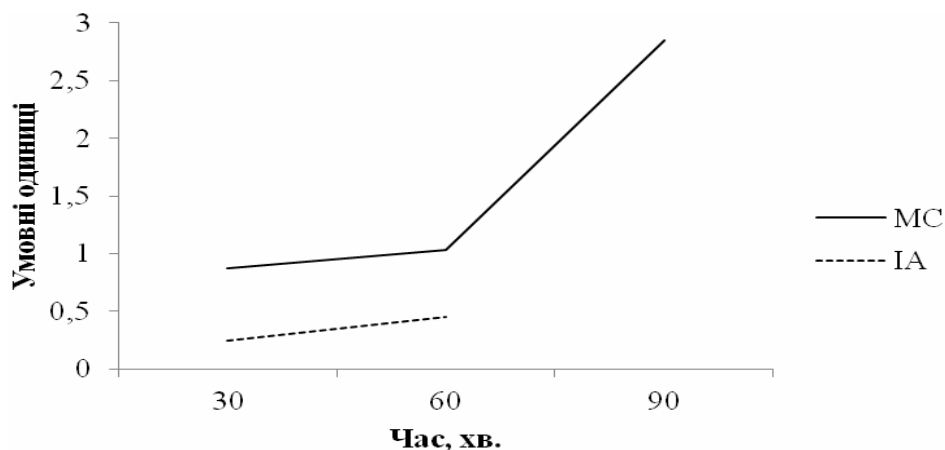


Рис. 1. Зміни проникності кишечника щурів у контрольній групі (МС) та на фоні розвитку експериментального коліту (ІА) за умов використання 3% розчину фарби ЕВ, введеної в ізольовану ділянку кишки

при обох шляхах введення (пероральному та в ізольовану ділянку кишки), концентрацію ЕВ було зменшено в 2 рази.

Група 10. Введення 1,5% ЕВ контрольній групі (МС) не призвело до виявлення фарби в крові піддослідних тварин.

Група 11. У дослідній (ІА-групі) спостерігалося зростання проникності кишечника за умов розвитку експериментального виразкового коліту (рис.2).

Результати, отримані нами, узгоджуються з

даними Tolstanova та співав. (2012), які показали збільшення епітеліальної проникності кишечника на фоні ІА-індукованого коліту через 1 та 2 год [13].

Висновки

1. Встановлено, що при пероральному введенні рух фарби ЕВ вздовж травного каналу більш повільний у щурів з експериментальним колітом, порівняно з контрольними щурами, тому цей ме-

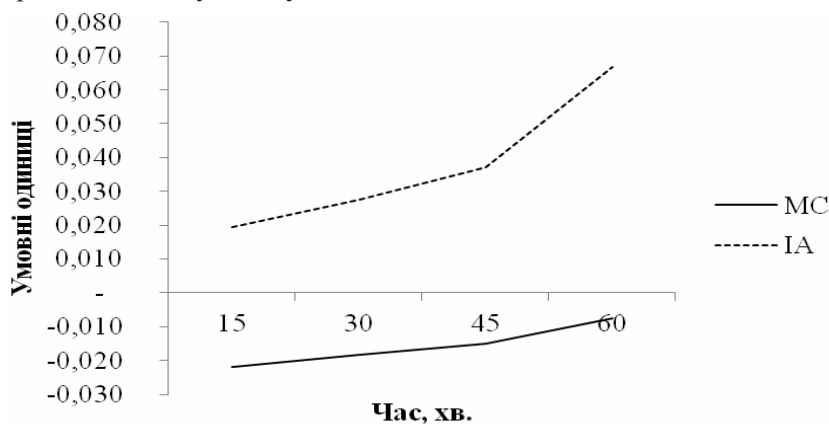


Рис. 2. Зміни проникності кишечника щурів у контрольній групі (МС) та на фоні розвитку експериментального коліту (ІА) за умов використання 1,5% розчину фарби ЕВ, введеної в ізольовану ділянку кишки

тод є ненадійним для дослідження змін епітеліальної проникності кишечника.

2. Використання 3% концентрації фарби Еванса при пероральному та введенні в ізольовану ділянку кишки, призводить до летальних наслідків у експериментах на щурах лінії Wistar та не може бути рекомендованим до використання.

3. Оптимальними умовами проведення досліджень змін епітеліальної проникності товстої кишки на щурах лінії Wistar є використання 1,5% фарби ЕВ введеної в ізольовану ділянку товстої кишки через 2 години після моделювання виразкового коліту за допомогою йодоацетаміду та забір крові через 15, 30, 45 та 60 хвилинні проміжки.

Перспективи подальших досліджень

Буде проведена робота по отриманню патента на запропонований метод.

References. 1. Hayakawa K. A Study for collecting background data on Wistar Hannover rats in general toxicity studies - comparative data to Sprague Dawley rats / K. Hayakawa, Y. Mimura, S. Tachibana [et al.] // *J. Toxicol. Sci.* - 2013. - Vol. 38. - No. 6. - P. 855-873. 2. Hueper W.C. Experimental Studies in Cardiovascular Pathology. VIII. Late Vascular Reactions of Histamine Shock in Dogs / W.C. Hueper, C.T. Ichniowski // *Arch. Surg.* - 1944. - Vol. 17. - P. 44. 3. Lange S. Evans Blue Permeation of Intestinal Mucosa in the Rats / S. Lange, D.S. Delbro, E. Jennische // *Scand J Gastroenterol.* - 1994. - Vol. 29. - P. 38-46. 4. Larauche M. Cotragine, a CRF1 agonist, induces stresslike alterations of colonic function and visceral hypersensitivity in rodents primarily through peripheral pathways / M. Larauche, G. Gourcerol, L. Wang [et al.] // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* - 2009. - Vol. 297. - P. G215 - G227. 5. Markus G.A. A polarographic study of Evans blue and its combination with plasma proteins / G. Markus, J. Baumberger // *J. Biol. Chem.* - 1954. - Vol. 206. - P. 59 - 65. 6. Nylander O. Characterization of 51-Cr-EDTA as a marker of duodenal mucosal permeability / O. Nylander, M. Sahabi, J. Bark // *Acta Physiol Scand.* - 1991. - Vol. 143. - P. 117 - 126. 7. Ohama T. Mechanism of abnormal intestinal motility in inflammatory bowel disease: how smooth muscle contraction is reduced? / T. Ohama, M. Hori, H. Ozaki // *J. Smooth Muscle Res.* - 2007. - Vol. 43. - N. 2. - P. 43 - 54. 8. O'Malley D. Interleukin-6 modulates colonic transepithelial ion transport in the stress-sensitive Wistar Kyoto rat / D. O'Malley, T.G. Dinan, J. F. Cryan // *Frontiers in Pharmacology | Gastrointestinal Pharmacology.* - 2012. - Vol. 3. - Article 190. - P. 1 - 7. 9. Pastorelli L. Central role of the gut epithelial barrier in the pathogenesis of chronic intestinal inflammation: lessons learned from animal models and human genetics / L. Pastorelli, C. DeSalvo, J.R. Mercado, M. Vecchi, T.T. Pizarro // *Frontiers in Immunology.* - 2013. - Vol. 4. - P. 1 - 22. 10. Przystas W. Biological Removal of Azo and Triphenylmethane Dyes and Toxicity of Process By-Products / W. Przystas, Zablocka- E. Godlewska, E. Grabinska-Sota // *Water Air Soil Pollut.* - 2012. - Vol. 223. - P. 1581-1592. 11. Roberts L. N. Evans Blue Toxicity / L.N. Roberts // *Canad. M.A.J.* - 1954. - Vol. 71. - P. 489 - 491. 12. Satoh H. New Ulcerative Colitis Model Induced by Sulfhydryl Blockers in Rats and the Effects of Antiinflammatory Drugs on the Colitis / H. Satoh, F. Sato, K. Takami, S. Szabo // *Jpn. J. Pharmacol.* - 1997. - Vol. 73. - P. 299 - 309. 13. Tolstanova G. Early endothelial damage and increased colonic vascular permeability in the development of experimental ulcerative colitis in rats and mice / G. Tolstanova, X. Deng, S. W. French [et al.] // *Laboratory Investigation.* - 2012. - Vol. 92. - P. 9 - 21. 14. Turgeon N. HDAC1 and HDAC2 Restrain the Intestinal Inflammatory Response by Regulating Intestinal Epithelial Cell Differentiation / N. Turgeon, M. Blais, J.-M. Gagne // *PLOS ONE.* - 2013. - Vol. 8. - Issue 9. - P. 1 - 17.

МЕТОД ИЗМЕРЕНИЯ ПРОНИЦАЕМОСТИ ЭПИТЕЛИЯ ТОЛСТОЙ КИШКИ КРЫС В РАЗНЫЕ СРОКИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО КОЛИТА

А.И. Афицкая, Т.В. Довбинчук, Ю.В. Голота, Т.М. Червинская, Г.М. Толстанова

Резюме. Был проведен анализ существующих методов исследования барьерной функции эпителия толстой кишки при воспалительных заболеваниях кишечника и адаптирован метод определения проницаемости эпителия толстой кишки для крыс линии Wistar за проникновением краски Эванс синий из кишечника в кровь. Сделаны выводы о большей чувствительностью крыс линии Wistar, по сравнению с крысами линии Sprague-Dawley, к токсическим воздействиям больших количеств красок. Установлено, что при пероральном введении движение краски ЭВ вдоль пищеварительного канала более медленный у крыс с экспериментальным колитом, по сравнению с контрольными крысами, поэтому этот метод является ненадежным для исследования изменений эпителиальной проницаемости кишечника.

Использование 3% концентрации краски Эванс при пероральном и введении в изолированный участок кишки, приводит к летальному исходу в экспериментах на крысах линии Wistar и не может быть рекомендован к использованию.

Оптимальными условиями проведения исследований изменений эпителиальной проницаемости толстой кишки на крысах линии Wistar является введение в изолированный участок толстой кишки 1,5% краски ЭВ и определения ее концентрации в образцах плазмы крови через 15, 30, 45 и 60 минут.

Ключевые слова: проницаемость эпителия, язвенный колит, толстая кишка, методы исследования эпителиального барьера.

THE METHOD OF THE MEASUREMENT OF THE COLONIC EPITHELIAL PERMEABILITY IN RATS DURING DIFFERENT TERMS OF THE EXPERIMENTAL COLITIS

A.I. Afitska, T.V. Dovbychuk, Y.V. Holota, T.M. Chervinska, G.M. Tolstanova

Abstract. It was analyzed existing studies of epithelial barrier function in inflammatory bowel diseases and adapted the method of the colonic epithelial permeability in Wistar rats by Evans blue permeation from intestine into the blood. It was concluded about greater sensitivity of the Wistar rats compared to Sprague-Dawley and toxic effect of the high concentrations of the EB (3%). It's more advisable usage of 2-fold less concentration of EB. It was established that EB moved more slow along the intestinal tract during experimental colitis comparing to the control group after per-os administration of EB. Such way of administration of EB is not recommended for usage in the colonic epithelial permeability. The optimal conditions of the studies on the colonic epithelial permeability is usage of the 1,5% EB administrated into isolated colonic loop and blood sampling in 15, 30, 45 and 60 minutes after EB administration.

Key words: epithelial permeability, ulcerative colitis, colon, methods of the intestinal barrier function investigations.

Educational and scientific centre "Institute of Biology" of Taras Shevchenko National University of Kyiv

Clin. and experim. pathol. - 2015. - Vol. 14, №4 (54). - P. 09-13.

Надійшла до редакції 28.09.2015

Рецензент – проф. В.Ф. Мислицький

© А.І. Афіцька, Т.В. Довбинчук, Ю.В. Голота, Т.М. Червінська, Г.М. Толстанова, 2015