УДК 669.5:61

СТАН ПАНКРЕАТИЧНИХ ОСТРІВЦІВ МИШЕЙ І ЩУРІВ ПРИ ВВЕДЕННІ СУЛЬФАТУ МІДІ ТВАРИНАМ, ОТРИМАВШИМ АЛОКСАН

Н.В. Григорова

Запорізький національний університет

Исследования влияния сульфата меди и аллоксана на инсулярный аппарат были проведены на мышах и крысах. После инъекции аллоксана наблюдалось избирательное повреждение панкреатических клеток В. Тяжесть повреждений этих клеток усиливалась при введении сульфата меди аллоксановым животным.

Аллоксан, В-клетки, инсулин, сульфат меди, цинк

ВСТУП

Для оцінки стану панкреатичних острівців застосовують методи визначення цинку та інсуліну в клітинах В. Дефіцит цих компонентів спостерігається при діабеті [2]. Дослідження вмісту цинку в клітинах при цукровій хворобі є дуже актуальними, враховуючи важливість біологічних функцій цього металу [1, 3, 5, 6, 8, 10, 11, 14, 19]. Більшість відомих металоензимів містять цинк [1, 6, 10, 16, 18, 20]. Він стабілізує клітинні мембрани [4, 6, 8, 10, 12]. Відомо, що два іони цинку зв'язують шість молекул інсуліну з утворенням «депо-форми» гормону [3, 13–15, 17].

Значна кількість людей має приховану форму діабету, яка може переходити в перманентну за дії екстремальних, у тому числі екологічно несприятливих чинників. Особливої уваги заслуговують токсичні метали, які є продуктами та відходами промислового виробництва.

Мета даного дослідження – вивчити вплив сульфату міді на стан панкреатичних клітин В у алоксанових тварин.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У дослідах було використано 41 миша і 47 щурів. 15 мишей і 17 щурів були контрольними (інтактними), інші тварини отримали діабетогенний агент алоксан і розчин сульфату міді. Ін'єкцію алоксану робили підшкірно у вигляді 5%-вого водного розчину в дозі 200–400 мг/кг. Сульфат міді уводили

тваринам через зонд у шлунок щодня протягом 5 днів після призначення діабетогенного агенту в дозі 2–5 мг/кг у вигляді 0,02%-вого розчину.

Для цитохімічного визначення цинку шматочки підшлункової залози фіксували впродовж 12 год у холодному (+4 ºС) ацетоні, потім витримували в двох ксилолах протягом 15 хв у кожному, суміші 50%-вого ксилолу та 50%-вого парафіну (30 хв при 40 ºС), двох рідких парафінах (по 1,5 год у кожному при 56 °С) та замикали в парафін.

Зрізи 5–10 мкм завтовшки депарафінували в двох ксилолах (по 3 хв у кожному), спиртах (абсолютному, 96º, 90º, 80º, 70º по 3 хв у кожному), дистильованій воді (5 хв).

У випадку постановки цитохімічної реакції дитизону використовували 0,2%-вий (робочий) його розчин. Тривалість фарбування – 3 год.

Розчин дитизону готували в такий спосіб. У колбочку з кришкою, що щільно закривається, наливали 30 мл дистильованої води. Сюди додавали 0,6 мл 25%-вого розчину гідроксиду амонію, 400 мг дитизону. Суміш перемішували на водяній бані при 70 ºС протягом 10 хв, потім фільтрували через беззольний фільтр. При цьому одержували 1%-вий водно-аміачний розчин дитизону, тому що чверть його наважки залишалася на фільтрі. Робочий розчин реагенту одержували шляхом п’ятикратного розведення його основного розчину.

Після закінчення терміну фарбування зрізи промивали у двох порціях дистильованої води (по 5 хв у кожній) і замикали в гліцерин-желатин. Зрізи розглядали під світловим мікроскопом. На препаратах у цитоплазмі острівцевих клітин В виявлялися гранули червоного кольору.

У випадку з постановкою цитохімічної реакції 8–(п-толуолсульфоніл-аміно)–хіноліну (8–ТСХ) на зрізи наносили на 1 хв по декілька крапель 0,01%-вого ацетонового розчину цього реагенту.

Потім їх впродовж 5 хв промивали у дистильованій воді, замикали в гліцерин і розглядали під люмінесцентним мікроскопом (світлофільтри ФС–1, ЖС–18). На препаратах у цитоплазмі панкреатичних клітин В визначали гранули, що люмінесценціювали жовто-зеленим світлом.

Для цитохімічного визначення інсуліну в панкреатичних острівцях шматочки підшлункової залози фіксували протягом 24 год у рідині Буена (суміші розчинів пікринової і оцтової кислот, формаліну), проводили через

спирти зростаючої міцності (70º, 80º, 90º, 96º, абсолютний – по 4 год у кожному), ксилоли і парафін, як вказано вище.

Зрізи 5–10 мкм завтовшки депарафінували, як було вказано вище, витримували в окиснику (суміші перманганату калію та сірчаної кислоти) до порудіння, у відновнику (розчині щавлевої кислоти) – до знебарвлення, дистильованій воді (5 хв). Зрізи витримували протягом 6 хв у 0,25%-вому спиртовому розчині альдегідфуксину (АФ), обробляли солянокислим спиртом, промивали водопроводною водою, обробляли у спиртах, ксилолах, замикали в бальзам і досліджували під світловим мікроскопом з масляною імерсією. На препаратах інсулін визначали в цитоплазмі острівцевих клітин В у вигляді зернистості синьо-фіолетового кольору.

Інтенсивність цитохімічних реакцій оцінювали за трибальною системою, запропонованою В.В. Соколовським [7], а також Ф. Хейхоу та Д. Квагліно [9].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В інсулінпродукуючих клітинах В мишей контрольної групи вміст цинку, визначений за допомогою цитохімічної реакції дитизону, складав 1,9±0,17 ум.од., реакції з 8-ТСХ – 2,0±0,16 ум.од. Вміст інсуліну дорівнював 1,5±0,12 ум.од. (табл.1).

Таблиця 1 – Інтенсивність цитохімічних реакцій дитизону, 8-ТСХ та альдегідфуксину в панкреатичних клітинах В мишей при введенні алоксану і сульфату міді ($\overline{X}$ ± m)

Група тварин	Інтенсивність реакції, ум.од.		
	дитизону	8-ТСХ	альдегідфуксину
Контроль (n=15)	1,9±0,17	2,0±0,16	1,5±0,12
Алоксан (n=14)	$0,6\pm0,04^{***}$	$0,7\pm0,05^{***}$	$0,3\pm0,03^{***}$
Алоксан + сульфат міді (n=12)	$0,4\pm0,02^{***}_{\#\#\#}$	$0,5\pm0,03^{***}_{\#\#\#}$	$0,2\pm0,02^{***}_{\#\#}$

Примітка: *** – p<0,001 відносно контролю; ## – p<0,01, ### – p<0,001 відносно алоксанових тварин

При введенні алоксану інтенсивність дитизонової реакції у досліджених клітинах зменшувалася на 68 % (p<0,001), 8-ТСХ-реакції – на 65 % (p<0,001), альдегідфуксину – на 80 % (p<0,001). У випадку спільного впливу алоксану та сульфату міді кількість цього металу була зменшена

відповідно на 79 % (p<0,001) і 75 % (p<0,001), а інсуліну – 87 % (p<0,001). При порівнянні даних, отриманих у випадку введення алоксану, а також після спільного впливу сульфату міді та алоксану, вміст цинку був нижче на 33 % (p<0,001) при постановці дитизонової реакції, 29 % (p<0,001) – реакції 8-ТСХ, а вміст інсуліну – на 33 % (p<0,01).

Про вплив сульфату міді на вміст цинку в В-інсулоцитах алоксанових щурів можна судити на підставі даних табл. 2.

Таблиця 2 – Інтенсивність цитохімічних реакцій дитизону, 8-ТСХ та альдегідфуксину в панкреатичних клітинах В щурів при введенні алоксану і сульфату міді ($\overline{X} \pm m$)

Група тварин	Інтенсивність реакції, ум.од.		
	дитизону	8-ТСХ	альдегідфуксину
Контроль (n=17)	0,5±0,03	0,6±0,05	1,6±0,14
Алоксан (n=16)	$0,2\pm0,02^{***}$	$0,2\pm0,01^{***}$	$0,3\pm0,04^{***}$
Алоксан + сульфат міді (n=14)	$0,1\pm0,02^{***}_{\#\#\#}$	$0,1\pm0,01^{***}_{\#\#\#}$	$0,2\pm0,01^{***}_{\#}$

Примітка: *** – p<0,001 відносно контролю; $^{\#}$ – p<0,05, $^{\#\#\#}$ – p<0,001 відносно алоксанових тварин

У клітинах В острівців щурів контрольної групи вміст цинку, визначений за допомогою цитохімічної реакції дитизону, складав 0,5±0,03 ум.од., реакції 8-ТСХ – 0,6±0,05 ум.од., інсуліну – 1,6±0,14 ум.од.

Ін'єкція алоксану призводила до падіння в панкреатичних острівцях інтенсивності дитизонової реакції на 60 % (p<0,001), реакції 8-ТСХ – на 67 % (p<0,001), альдегідфуксину – на 81 % (p<0,001). Після сполученої дії алоксану та сульфату міді вміст металу був нижче норми на 80 % (p<0,001) при забарвленні дитизоном, 83 % (p<0,001) – забарвленні 8-ТСХ, 87 % (p<0,001) – альдегідфуксином. Порівняно з алоксановими тваринами у щурів, які отримали алоксан і сульфат міді, інтенсивність реакцій дитизону та 8-ТСХ була нижче на 50 % (p<0,001), альдегідфуксину – на 33 % (p<0,05).

Таким чином, сульфат міді підсилює дефіцит цинку в клітинах, який викликає алоксан.

Враховуючи зростання з кожним роком частоти захворювань діабетом у мешканців індустріальних регіонів, будуть проведені дослідження впливу інших промислових факторів на стан панкреатичних острівців у експериментальних тварин, які отримали діабетогенний агент.

ВИСНОВКИ

1. При введенні алоксану спостерігалося зниження вмісту в панкреатичних клітинах В мишей цинку на 65–68 %, інсуліну – на 80 %. У щурів отримані дані відповідно 60–67 % та 81 %.
2. При введенні алоксановим тваринам сульфату міді у мишей відмічалося зниження вмісту цинку на 75–79 %, інсуліну – 87 %, а у щурів – відповідно на 80–83 % та 87 %.
3. Сульфат міді призводив до збільшення в клітинах В пошкоджень, які викликалися алоксаном.

ЛІТЕРАТУРА:

1. *Васильев А.В., Ивахненко В.И., Хомитченко С.А., Корж В.В. Влияние алиментарного микроэлементоза на активность глутатион-пероксидазы и супероксиддисмутазы // Биомедицинская химия. – 2008. – Т.51, Вып.2. – С. 236–243.*
2. *Гольдберг Е.Д., Ещенко В.А., Бовт В.Д. Сахарный диабет. Этиологические факторы. – Томск: Изд-во Томск.ун-та, 1993. – 136 с.*
3. *Гутаревич Г.О., Щербак С.О. Участь мікроелементів у регуляції вуглеводного обміну людини // Ендокринологія. – 2002. – Т. 7, № 1. – С. 133.*
4. *Дереча Л.М. Стан біологічних мембран та вміст макро- і мікроелементів в організмі тварин і людини при дії етанолу: Автореф. дис. … канд. біол. наук: 03.00.04. – Харків. нац. ун-т ім. В.Н. Каразіна, 2006. – 20 с.*
5. *Кутырева М.П., Галимзанова Р.Р., Улахович Н.А., Глушков Н.И. Влияние ионов цинка (II) и марганца (II) на каталитическую активность индуцируемой аспарагиновой протеиназы Candida Albicans // Биомедицинская химия. – 2007. – Т. 53, Вып. 1. – С. 72–85.*
6. *Скальный А.В. Химические элементы в физиологии и экологии человека. – М.: Оникс 21 век, 2004. – 216 с.*
7. *Соколовский В.В. Гистохимические исследования в токсикологии. – Л.: Медицина, 1971. – 172 с.*
8. *Стволинский С.Л., Федорова Т.Н., Юнева М.О., Болдырев А.А. Защита Cu, Zn – COD карнозином при нарушениях окислительного метаболизма в мозге in vivo // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2003. – Т. 135, № 2. – С. 151–*

154.

9. *Хейхоу Ф., Кваглино Д. Гематологическая цитохимия. – М.: Медицина, 1983. – 320 с.*
10. *Чмиленко Ф.О., Чмиленко Т.С., Сапа Ю.С., Саєвич О.В. Хімічні елементи і речовини в організмі людини у нормі та в патології: Укр.-рос.довідник. – Д.: Вид-во Дніпропетр. ун-ту, 2006. – 216 с.*
11. *Berger A. What does zinc do ?// BMJ. – 2002. – Vol. 325, № 7372. – P. 1059.*
12. *Brocardo P.S., Pandolfo P.,Taikahashi R.H., Rodrigues A.L., Dafre A.L. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in the cerebral cortex and hippocampus following acute exposure to malathion and / or zinc chloride // Toxicology. – 2005. – Vol. 207, N2. – P. 283–291.*
13. *Chausmer A.B. Zinc, insulin and diabetes // J.Am.Coll.Nutr. – 1998. – Vol. 17, № 2. – P. 109–115.*
14. *Rosenfeld L. Insulin: discovery and controversy // Clin. Chem. – 2002. – Vol. 48, № 12. – P. 2270–2288.*
15. *Seale A.P., de Jesus L.A., Kim S.J., Choi J.H., Lim H.B., Hwang C.S., Kim J.S. Development of an automated protein – tyrosine phosphatase 1 B inhibition assay and the screening of putative insulin – enhancing vanadium (IV) and zinc (II) complexes // Biotechnol. Lett. – 2005. – Vol. 27, № 4. – P. 221–225.*
16. *Shin S.J., Lee H.S., Kwon S.T., Kwak S.S. Molecular characterization of a cDNA encoding copper/zinc superoxide dismutase from cultured cells of Manihot esculenta // Plant Physiol. Biochem. – 2005. – Vol. 43, № 1. – P. 55–60.*
17. *Song E.S., Daily A., Fried M.G., Juliano M.A., Juliano Z., Hersh L.B. Mutation of active site residues of insulin degrading enzyme alters allosteric interactions // J. Biol.Chem. – 2005. – № 3. – P. 175–179.*
18. *Story S.V., Shah C., Jenney F.E. Ir., Adams M.W. Characterization of a novel zinc – containing, lysine – specific aminopeptidase from the hypertermophilic archaeon Pyrococcus furiosus // J. Bacteriol. – 2005. – Vol. 187, № 6. – P. 2077–2083.*
19. *Tudor R., Zalewski P.D., Ratnaike R.N. Zinc in health and chronic disease // J. Nutr. Health Aging. – 2005. – Vol. 9, № 1. – P. 45–51.*
20. *Varvarra G., Traini T., Esposito P., Caputi S., Perinetti G. Copper – zinc superoxide dismutase activity in healthy and inflamed human dental pulp // Int. Endod. J. – 2005. – Vol. 38, № 3. – P. 195–199.*

PANCREATIC ISLET STATE IN MICE AND RATS UNDER COPPER SULFATE ADMINISTRATION TO ANIMALS, RECEIVED ALLOXAN

N.V. Grigorova

Investigations of copper sulfate and alloxan influence on insular apparatus were carried out on mice and rats. Selective damage of pancreatic beta-cells was observed in animals after alloxan injection. Injuries severity of these cells increased under copper sulfate administration to alloxan animals.

УДК 669.5:61

Григорова Н.В. Стан панкреатичних острівців мишей і щурів при введенні сульфату міді тваринам, отримавшим алоксан // Питання біоіндикації та екології. – Запоріжжя: ЗНУ, 2008. – Вип. 13, № 2. – С. 163–169.

Дослідження впливу сульфату міді та алоксану на інсулярний апарат були проведені на мишах і щурах. Після ін’єкції алоксану спостерігалось вибіркове пошкодження панкреатичних клітин В. Тяжкість пошкоджень цих клітин підсилювалась при введенні сульфату міді алоксановим тваринам.

Бібл. 20. Табл. 2.