

ВПЛИВ ХЛОРИДУ АЛЮМІНІЮ НА ВМІСТ ЦИНКУ ТА ІНСУЛІНУ В ПАНКРЕАТИЧНИХ КЛІТИНАХ В МИШЕЙ З ДИТИЗОНОВИМ ДІАБЕТОМ

Н.В. Григорова, Ю.В. Єщенко, В.Д. Бовт, В.А. Єщенко

Запорізький національний університет

В опытах на мышах было показано развитие гипергликемии, дефицита цинка и инсулина в панкреатических клетках В после инъекции дитизона. Выраженность этих изменений усиливалась при введении хлорида алюминия дитизоновым животным.

Гликемия, дитизон, инсулин, панкреатические клетки В, хлорид алюминия, цинк

ВСТУП

Цукровий діабет є одним із найпоширеніших ендокринних захворювань. Механізм його розвитку досі остаточно не з'ясовано. Необхідні дослідження за допомогою експериментальних моделей діабету. З цією метою тваринам вводять діабетогенний агент дитизон. Не вивчена дія факторів, які впливають на розвиток дитизонового діабету. В індустріально розвинених регіонах організм людини та тварин зазнає дії несприятливих екологічних факторів, наприклад, продукту виробництва – алюмінію. Тому представляє інтерес дослідження впливу солі цього металу на вміст цинку та інсуліну в панкреатичних клітинах В діабетичних тварин. Цинк є дуже важливим металом в організмі людини та тварин [5–8, 12–14, 17–20]. Він є необхідним для активності значної кількості ферментів [2, 7, 11–13, 17–19]. Цинк стабілізує клітинні мембрани не тільки шляхом утворення містків між лігандними групами мембран, а також внаслідок активації супероксиддисмутази [1, 2, 7, 12, 13, 17]. Цинк відіграє важливу роль у регуляції вуглеводного обміну в організмі [3, 4]. Відомо, що два іони цинку зв'язують шість молекул інсуліну [14–16, 18]. За дії несприятливих екологічних чинників порушуються ензиматична активність і проникність клітинних мембран.

Мета роботи – вивчити вплив хлориду алюмінію на стан інсулярного апарату дитизонових мишей.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У дослідах було використано 47 мишей. 17 тварин були контрольними (інтактними), інші отримали діабетогенний агент дитизон і розчин хлориду алюмінію. Ін'єкцію дитизону робили внутрішньочеревинно в дозі 50–100 мг/кг у вигляді 1%-вого розчину. Хлорид алюмінію в дозі 100 мг/кг у вигляді 0,4%-вий розчину вводили мишам через зонд у шлунок щодня протягом 5 днів після призначення діабетогенного агенту.

Для приготування дитизонового розчину в колбу, що герметично зачиняється, наливали 45 мл дистильованої води, 0,9 мл 25%-вого розчину гідроксиду амонію, додавали 600 мг дитизону. Суміш перемішували на водяній бані (70 °C) протягом 10 хв і фільтрували. Отриманий фільтрат являв собою 1%-вий водно-аміачний розчин дитизону.

У тварин перед забиванням брали кров з хвоста для визначення рівня цукру в крові модифікованим методом Хаггедорна-Йенсена. Забивали мишей декапітацією. Шматочки підшлункової залози фіксували в холодному (+4 °C) ацетоні (для цитохімічного визначення цинку) та рідині Буена (для цитохімічного визначення інсуліну).

Шматочки залози, фіксовані в ацетоні, проводили через ксилоли, суміш ксилолу та парафіну (40 °C), а також два рідких парафіни (56 °C), після чого заливали в парафін. У випадку з використанням рідини Буена шматочки спочатку зневоднювали в серії спиртів зростаючої міцності, а потім доводили через ксилоли до парафіну, як вказано вище.

Парафінові зрізи готували 5–10 мкм завтовшки. Депарафінували їх витримуванням у двох ксилолах, двох спиртах, дистильованій воді.

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

Потім зрізи промивали дистильованою водою, замикали в гліцерин-желатин і розглядали під світловим мікроскопом. На препаратах у цитоплазмі острівцевих клітин В виявлялися гранули червоного кольору.

Для постановки цитохімічної реакції 8-(п-толуолсульфоніламіно)-хіноліну (8-ТСХ) на зрізи підшлункової залози наносили по краплі 0,01%-вого ацетонового розчину цього реагенту. Потім зрізи промивали дистильованою водою, замикали в гліцерин і розглядали під люмінесцентним мікроскопом (світлофільтри ФС-1, ЖС-18). На препаратах у цитоплазмі

острівцевих клітин В виявляли гранули, що люмінесценціювали жовто-зеленим світлом.

Для постановки цитохімічної реакції альдегідфуксину зрізи залози обробляли після їх депарафінування в окислювачі та відновнику, промивали дистильованою водою та забарвлювали 0,25%-вим спиртовим розчином цього фарбника, промивали водопровідною водою, замикали в гліцерин-желатин і розглядали під світловим мікроскопом. На препаратах у цитоплазмі клітин В визначали синьо-фіолетові гранули.

Інтенсивність цитохімічних реакцій оцінювали за трибальною системою, запропонованою В.В. Соколовським [9], а також Ф. Хейхоу та Д. Квагліно [10].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У табл. 1 наведені дані рівня цукру в крові та інсуліну в острівцевих клітинах В у мишей при введенні дитизону та хлориду алюмінію.

У контрольних (інтактних) мишей глікемія складала $5,9 \pm 0,22$ ммоль/л, а інтенсивність цитохімічної реакції альдегідфуксину $1,5 \pm 0,13$ ум.од.

При введенні дитизону спостерігалось підвищення концентрації цукру в крові на 92 % ($p < 0,001$) та зниження вмісту інсуліну в В-клітинах на 53 % ($p < 0,001$). У випадку спільної дії дитизону та хлориду алюмінію була збільшена глікемія на 117 % ($p < 0,001$) та зменшений вміст інсуліну в панкреатичних острівцях на 67 % ($p < 0,001$). Порівняно з дитизоновими мишами у тварин, які отримали дитизон та хлорид алюмінію, вміст цукру в крові був вищим на 14 % ($p < 0,01$), а інтенсивність цитохімічної реакції альдегідфуксину – нижчою на 29 % ($p < 0,01$).

Таблиця 1 – Глікемія та інтенсивність цитохімічної реакції альдегідфуксину в панкреатичних клітинах В мишей при введенні дитизону та хлориду алюмінію ($\bar{X} \pm m$)

Група тварин	Цукор крові, ммоль/л	Інтенсивність альдегідфуксинової реакції, ум.од.
Контроль (n=17)	$5,9 \pm 0,22$	$1,5 \pm 0,13$
Дитизон (n=16)	$11,3 \pm 0,38^{***}$	$0,7 \pm 0,05^{***}$
Дитизон + хлориду алюмінію (n=14)	$12,9 \pm 0,45^{***}_{##}$	$0,5 \pm 0,04^{***}_{##}$

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

Про вплив хлориду алюмінію на вміст цинку в інсулінпродукуючих клітинах дитизонових мишей можна судити на підставі даних табл. 2.

Таблиця 2 – Інтенсивність цитохімічних реакцій дитизону та 8-ТСХ у панкреатичних клітинах В мишей при введенні дитизону та хлориду алюмінію ($\bar{X} \pm m$)

Група тварин	Інтенсивність реакції, ум.од.	
	дитизону	8-ТСХ
Контроль (n=17)	1,9±0,16	2,0±0,17
Дитизон (n=16)	0,9±0,07***	1,0±0,08***
Дитизон + хлориду алюмінію (n=14)	0,7±0,05*** #	0,8±0,04*** #

Примітка: *** – $p < 0,001$ відносно контролю; # – $p < 0,05$ відносно дитизонових тварин

У В-інсулоцитах мишей контрольної групи вміст цинку, визначений за допомогою цитохімічної реакції дитизону, складав 1,9±0,16 ум.од., реакції 8-ТСХ – 2,0±0,17 ум.од.

При введенні дитизону інтенсивність дитизонової реакції у досліджених клітинах зменшувалася на 53 % ($p < 0,001$), 8-ТСХ-реакції – на 50 % ($p < 0,001$). Після сполученого впливу дитизону та хлориду алюмінію кількість цього металу в клітинах В була зменшена відповідно на 63 % ($p < 0,001$) і 60 % ($p < 0,001$). При порівнянні даних, отриманих у випадку введення дитизону, а також після спільної дії дитизону та хлориду алюмінію, вміст внутрішньоклітинного цинку був нижче на 22 % ($p < 0,05$) при постановці дитизонової реакції, 20 % ($p < 0,05$) – реакції 8-ТСХ.

Таким чином, хлорид алюмінію підвищує чутливість інсулінпродукуючих клітин у мишей до дитизону та його діабетогенної дії. У подальших дослідженнях буде вивчатись вміст цинку в інших, крім В-інсулоцитах, клітинах у дитизонових мишей, які зазнали впливу хлориду алюмінію.

ВИСНОВКИ

1. Після ін'єкції дитизону у мишей спостерігалось зростання рівня цукру в крові на 92 % і зниження вмісту в панкреатичних клітинах В інсуліну – на 53 %, цинку – на 50–53 %.
2. При введенні дитизоновим тваринам хлориду алюмінію відмічалось підвищення глікемії на 117 %, падіння рівня інсуліну – на 67 %, цинку – на 60–63 % у В-клітинах острівців.
3. Хлорид алюмінію підвищує пошкоджуючу дію діабетогенного агенту дитизону на інсулярний апарат мишей.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Басова Н.А., Марков Ю.Г., Берзинь Н.И. Действие природных (цинк, витамин Е) и синтетических (дилудин) антиоксидантов на проницаемость кишечного барьера у цыплят при недостаточности витамина Е // Рос. физиол. журнал. – 2002. – Т. 88, № 5. – С. 650–658.
2. Васильев А.В., Ивахненко В.И., Хомитченко С.А., Корж В.В. Влияние алиментарного микроэлементоза на активность глутатион-пероксидазы и супероксиддисмутаза // Биомедицинская химия. – 2008. – Т. 51, Вып. 2. – С. 236–243.
3. Гольдберг Е.Д., Ещенко В.А., Бовт В.Д. Сахарный диабет. Этиологические факторы. – Томск: Изд-во Томск. ун-та, 1993. – 136 с.
4. Гутаревич Г.О., Щербак С.О. Участь мікроелементів у регуляції вуглеводного обміну людини // Ендокринологія. – 2002. – Т. 7, № 1. – С. 133.
5. Коренюк И.И., Хусаинов Д.Р., Шульгин В.Ф. Салицилаты кобальта и цинка как функциональные аналоги иницирующего фактора в нервной системе моллюска // Нейрофизиология. – 2006. – Т. 38, № 1. – С. 11–17.
6. 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.
7. Скальный А.В. Химические элементы в физиологии и экологии человека. – М.: Оникс 21 век, 2004. – 216 с.
8. Сергієнко О.В. Роль мікроелементів у кровотворенні та оцінка мікроелементного спектра еритроцитів периферійної крові // Лікарська справа. – 2006. – Т. 1088, № 7. – С. 12–16.

9. Соколовский В.В. Гистохимические исследования в токсикологии. – Л.: Медицина, 1971. – 172 с.
10. Хейхоу Ф., Кваглино Д. Гематологическая цитохимия. – М.: Медицина, 1983. – 320 с.
11. Чандрю Х., Шарада А., Манджунас С. Экспрессия матриксной металлопротеиназы (ММП-2) и внеклеточного индуктора матриксных металлопротеиназ (EMMPRIN) в образцах тканей доброкачественных опухолей молочной железы // Биомедицинская химия. – 2007. – Т. 53, Вып. 4. – С. 461–467.
12. 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.
13. 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.
14. Chausmer A.B. Zinc, insulin and diabetes // J.Am.Coll.Nutr. – 1998. – Vol. 17, № 2. – P. 109–115.
15. Rosenfeld L. Insulin: discovery and controversy // Clin. Chem. – 2002. – Vol. 48, № 12. – P. 2270–2288.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. Story S.V., Shah C., Jenney F.E. Ir., Adams M.W. Characterization of a novel zinc – containing, lysine – specific aminopeptidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* // J. Bacteriol. – 2005. – Vol. 187, № 6. – P. 2077–2083.

20. 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.

**THE INFLUENCE OF ALUMINIUM CHLORIDE ON ZINC
AND INSULIN CONTENT IN MICE PANCREATIC BETA CELLS UNDER
DITHIZONE DIABETES**

N.V. Grigorova, J.V. Eshenko, V.D. Bovt, V.A. Eshenko

Development of hyperglycemia deficiency of zinc and insulin in pancreatic beta-cells was shown in experiments on mice, received dithizone. These changes expression was increased under the injections of aluminium chloride to dithizone animals.

УДК 669.5:61

Григорова Н.В., Єщенко Ю.В., Бовт В.Д., Єщенко В.А. Вплив хлориду алюмінію на вміст цинку та інсуліну в панкреатичних клітинах В мишей з дитизоновим діабетом // *Питання біоіндикації та екології*. – Запоріжжя: ЗНУ, 2009. – Вип. 14, № 1. – С. 144–150.

У дослідях на мишах було показано розвиток гіперглікемії, дефіциту цинку та інсуліну в панкреатичних клітинах В після ін'єкції дитизону. Вираженість цих змін підсилювалась при введенні хлориду алюмінію дитизоновим тваринам.

Бібл. 20. Табл. 2.