УДК [577.1.3:546.4]:612.393

ВМІСТ ЦИНКУ В КЛІТИНАХ РІЗНИХ ОРГАНІВ ЩУРІВ ПРИ ГІПОКСІЇ

Н.В. Григорова, Ю.В. Єщенко,
Є.Ю. Гороховський, А.К. Карпов, В.Д. Бовт
Запорізький національний університет

Исследовалось влияния гипоксии на содержание цинка в гранулоцитах крови, панкреатических островков, тонкой кишки, клетках предстательной железы, нейронах гиппокампа у крыс. Было установлено накопление цинка в клетках в остром опыте, его дефицит – в хроническом эксперименте. Фазовый характер изменений содержания этого металла в исследованных клетках можно отнести к признакам неспецифического адаптационного синдрома клеточной системы.

Цинк, гипоксия, гранулоциты, В-инсулоциты, клетки Панета, простата

ВСТУП

При пониженому вмісті кисню в зовнішньому середовищі може виникати нестача цього газу в організмі й пов’язані з ним зміни обміну речовин, діяльності функціональних систем, у тому числі нервової та ендокринної. Саме розходження в постачанні кисню та в його потребі організмом є підґрунтям для розвитку явищ, які звуться гіпоксичним станом. У літературі накопичився значний матеріал щодо впливу гіпоксії на морфофункціональний стан різних органів і систем [3, 7, 8], але в цих роботах відсутні відомості, що стосуються змін вмісту цинку в клітинах організму під впливом зазначеного фактора. Дослідження кількості в клітинах саме цього мікроелементу обумовлені значущістю його біологічної ролі. Основна частина відомих металоензимів містить цинк [4, 9–12]. Він необхідний для підтримання інтегральної структури і функції клітинних мембран [4, 9, 10, 13, 14]. Раніше таких досліджень не проводилось через брак досконалих методів цитохімічного визначення цинку. Розробка в умовах нашої лабораторії цитохімічних реакцій дитизону, сульфарсазену та 8-(п-толуолсульфоніламіно)-хіноліну (8-ТСХ) дозволила вирішити це питання [1, 2].

Мета роботи – вивчити вплив гіпоксії на вміст цинку в гранулоцитах крові, підшлункової залози, тонкої кишки та клітинах простати щурів.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У дослідах було використано 40 щурів. Для розвитку гіпоксичного стану в гострому досліді їх впродовж 30 хв витримували в скляних банках, які герметично зачиняли кришками. У хронічних експериментах такі процедури повторювали щоденно протягом 10 діб.

Через 2 год з початку експериментів у щурів з хвоста брали кров для приготування мазків. У декапітованих тварин брали тонкий кишечник, підшлункову та передміхурову залози.

Для цитохімічного визначення цинку в гранулоцитах крові використовували забарвлення дитизоном і сульфарсазеном мазків крові, фіксованих у парах формаліну. З цією метою в чашку Петрі наливали формалін у кількості 20 мл. На дно чашки поміщали 2 скляні палички, на які мазками донизу клали предметні стекла. Чашку закривали кришкою. Тривалість інкубації мазків у парах формаліну складала 5 хв. Потім кришку знімали, стекла вилучали з чашки та розміщували мазками догори в іншу чашку. На мазки наносили 0,2%-вий водно-аміачний розчин дитизону. Чашку закривали кришкою. Через 3 год кришку знімали, мазки промивали дистильованою водою протягом 5 хв, замикали в желатин і розглядали під світловим мікроскопом.

Робочий розчин дитизону отримували шляхом п’ятиразового розведення дистильованою водою основного його розчину. Для приготування останнього в колбочку з притертою пробкою наливали 30 мл дистильованої води, 0,6 мл 25%-ного розчину гідроксиду амонію, додавали 400 мг дитизону. Суміш перемішували на водяній бані

протягом 10 хв при 70 ºС. Потім суміш фільтрували через беззольний фільтр. Отриманий фільтрат являв собою 1%-вий основний водно-аміачний розчин дитизону.

На препаратах у цитоплазмі зернистих лейкоцитів виявляли гранули червоного кольору.

У випадку постановки цитохімічної реакції сульфарсазену фіксовані мазки на 3 год при 70 ºС занурювали в суміш, яка складалася з 1%-вого водного розчину ацетату натрію і 25%-вого водного розчину гідроксиду амонію. Потім мазки промивали в дистильованій воді, замикали в желатин і розглядали під світловим мікроскопом. На препаратах у цитоплазмі гранулоцитів виявлялась помаранчева зернистість.

Шматочки тонкої кишки, підшлункової і передміхурової залоз брали для цитохімічного визначення цинку на парафінових зрізах. Для цього шматочки органів фіксували в холодному ацетоні (4 ºС, 12 годин), потім проводили через два ксилоли (по 15 хв у кожному), суміш 50 %-вого ксилолу й 50 %-вого парафіну (30 хв при 37 ºС), 2 рідкі парафіни (по 1,5 год в кожному при 56 ºС) та заливали в парафін. Зрізи товщиною 5–10 мкм обробляли в двох порціях ксилолу (по 3 хв в кожному), двох спиртах (по 3 хв в кожному). На депарафіновані зрізи наносили по декілька крапель 0,01%-вого ацетонового розчину 8-(п-толуолсульфоніламіно)-хіноліну (8-ТСХ), потім зрізи промивали в дистильованій воді (5 хв при pH 8,5), замикали в гліцерин і розглядали під люмінесцентним мікроскопом. Для збудження люмінесценції застосовували світлофільтри ФС-1, як захисний (окулярний) використовували світлофільтр із скла ЖС-18. На препаратах у цитоплазмі В-інсулоцитів, клітин базальних відділів кишкових крипт (клітин Панета) та кінцевих відділів передміхурової залози виявляли зернистість, яка люмінесціювала жовто-зеленим світлом.

Інтенсивність цитохімічних реакцій оцінювали за трибальною системою, запропонованою В.В. Соколовським [5], а також Ф. Хейхоу і Д. Квагліно [6]. Середні величини ($\bar{X}$) встановлювали на підставі підрахунку інтенсивності реакції у 100 клітинах, обчислювали похибку (m) і показник вірогідності (P).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У табл. 1 наведені результати досліджень вмісту цинку в гранулоцитах крові щурів, які зазнали дії гіпоксії.

Таблиця 1 – Інтенсивність цитохімічних реакцій дитизону та сульфарсазену в гранулоцитах крові щурів при гіпоксії ($\bar{X} \pm m$)

Група тварин	Інтенсивність реакції, ум. од.	
	дитизону	сульфарсазену
Контроль (n = 14)	1,2±0,07	1,0±0,09
Гостра гіпоксія (n = 12)	1,6±0,13**	1,3±0,12*
Хронічна гіпоксія (n = 12)	0,9±0,05**	0,7±0,06*

Примітка: * – $P<0,05$; ** – $P<0,01$ порівняно з контролем

У контрольних (інтактних) тварин інтенсивність цитохімічної реакції дитизону в гранулоцитах крові дорівнювала в середньому 1,2±0,07 ум. од., а інтенсивність сульфарсазенової реакції – 1,0±0,09 ум. од. Гостра гіпоксія викликала у щурів підвищення інтенсивності дитизонової реакції у клітинах на 33 % ($P<0,01$), а реакції сульфарсазену – на 30 % ($P<0,01$). У хронічному експерименті кисневе голодування призводило до падіння у зернистих лейкоцитах інтенсивності реакції дитизона на 25 % ($P<0,05$), реакції сульфарсазену – на 30 % ($P<0,05$).

Ці дані вказують на те, що гіпоксія в гострому досліді викликає у щурів накопичення цинку в гранулоцитах крові, а в хронічному експерименті – дефіцит цього металу.

У табл. 2 представлені результати дослідження впливу гіпоксії на вміст цинку в клітинах внутрішніх органів.

У контрольних (інтактних) тварин вміст цинку в панкреатичних клітинах В складав 0,5±0,03 ум. од., в клітинах Панета − 2,1±0,15 ум. од., у клітинах простати – 1,8±0,14 ум. од. Після гострої гіпоксії спостерігалось зростання вмісту металу на 40 % (P<0,01) в панкреатичних острівцях, на 33 % (P<0,01) – у тонкій кишці, на 33 % (P<0,05) – у передміхуровій залозі. В умовах хронічної гіпоксії у щурів рівень цинку знижувався на 20 % (P<0,05) в панкреатичних клітинах В, 24 % (P<0,05) – у клітинах Панета, 28 % (P<0,05) – у клітинах простати.

Таблиця 2 – Інтенсивність цитохімічної реакції 8-ТСХ у В-інсулоцитах, клітинах Панета та кінцевих відділів передміхурової залози щурів при гіпоксії ($\bar{X} \pm m$)

Група тварин	Інтенсивність реакції, ум. од.		
	В-інсулоцити	клітини Панета	клітини простати
Контроль (n = 14)	0,5±0,03	2,1±0,15	1,8±0,14
Гостра гіпоксія (n = 12)	0,7±0,05**	2,8±0,20**	2,4±0,17*
Хронічна гіпоксія (n = 12)	0,4±0,02*	1,6±0,12*	1,3±0,09*

Примітка: * − P<0,05; ** − P<0,01 порівняно з контролем

Таким чином, гіпоксія в щурів викликає фазний характер змін вмісту цинку в досліджених клітинах: підвищення його рівня в гострому досліді, зниження − в хронічному експерименті. Встановлені зміни клітинного метаболізму цинку при дії гіпоксії можна віднести до ознак неспецифічного адаптаційного синдрому клітинної системи.

Результати досліджень підкріплюють також положення про можливі функціональні зв'язки між гранулоцитами крові, панкреатичних острівців, тонкої кишки та клітинами простати [1, 2].

Перспективами подальших досліджень є вивчення комбінованої дії гіпоксії та інших екологічних несприятливих факторів та вміст цинку в клітинах.

ВИСНОВКИ

1. Гостра гіпоксія у щурів викликала підвищення вмісту цинку в досліджених клітинах на 33−40 %, а хронічне кисневе голодування, навпаки, його зниження на 20−29 %.
2. Фазний характер змін вмісту цинку в клітинах при гіпоксичному стані організму можна віднести до ознак неспецифічного адаптаційного синдрому клітинної системи.

ЛІТЕРАТУРА:

1. *Берегова Т.В., Григорова Н.В., Єщенко Ю.В., Бовт В.Д., Єщенко В.А. Зміни вмісту цинку в крові та клітинах різних органів при стресових впливах // Фізіологічний журнал. – 2007. – Т. 53, № 6. – С. 29−33.*
2. *Берегова Т.В., Григорова Н.В., Єщенко Ю.В., Бовт В.Д., Єщенко В.А. Функціональні взаємозв'язки інсулярного апарату з гіпокампом // Доповіді НАНУ. – 2008. − № 8. – С. 149−152.*

3. *Кислородное голодание и способы коррекции гипоксии / Под. ред. В.А. Березовского. – К.: Наукова думка, 1990. – 211 с.*
4. *Скальный А.В. Химические элементы в физиологии и экологии человека. – М.: Оникс 21 век, 2004. – 216 с.*
5. *Соколовский В.В. Гистохимические исследования в токсикологии. – Л.: Медицина, 1971. – 172 с.*
6. *Хейхоу Ф., Кваглино Д. Гематологическая цитохимия. – М.: Медицина, 1983. – 320 с.*
7. *Хитров Н.К., Пауков В.С. Адаптация сердца к гипоксии. – М.: Медицина, 1991. – 240 с.*
8. *Регеда М.С., Любінець Л.А., Бідюк М.М., Качмарська М.О. Гіпоксія. – Львів: Сполом, 2006. – 54 с.*
9. *Berger A. What does zinc do? // BMJ. – 2002. – Vol. 325. − №7372. – P. 1059.*
10. *Brocardo P.S., Pandolfo P., Takahoshi N.N., 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, № 2. – P. 283−291.*
11. *Furner A.J. Exploring the structure and function of zinc metallopeptidase: old enzyme and new discoveries // Biochem. Soc. Frans. – 2003. – Vol. 31 (Pt 3). – P. 723−727.*
12. *Tax X., Bramlett M.R., Lindahe P.A. Effect of Zn on acetyl coenzyme A synthase: evidence for a conformational change in the alpha subunit during catalysis // J. Am. Chem. Soc. – 2004. – Vol. 126, № 9. – P. 595−5955.*
13. *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.*
14. *Varvarra G., Traini T., Esposito P., Caputti S., Perinetti G. Copper-zinc superoxide dismutase activity in healthy and inflamed human dental pulp // Int. Endocr. J. – 2005. – Vol. 38, № 3. – P. 195−199.*
15. *Williams R.T. Metalloenzyme catalysis // Chem. Commun. (Gamb.) – 2003. − № 10. – P. 1109−1113.*

ZINC CONTENT IN THE CELLS BY HYPOXIA

Grigorova N.V., Eshchenko J.V., Gorohovsky E.J., Karpov A.K., Bovt V.D.

The influence of hypoxia on zinc content in rat blood granulocytes, pancreatic islands, intestine and prostate was investigated. It was established cell zinc accumulation by acute experiment and it's deficit by chronic one. Phase character of this metal changes in the cells investigated may be attributed to the signs of nonspecific adaptation syndrome of the cell system.