УДК 669.5:61

СТАН НЕЙТРОФІЛІВ КРОВІ ПРИ ДЕФІЦИТІ ЦИНКУ ТА ЙОГО КОРЕКЦІЇ

Григорова Н. В.

При дії на організм несприятливих факторів у клітинах розвиваються зміни, які визначені терміном “неспецифічний адаптивний синдром клітинної системи” (НАСКС) [1]. Описані деякі ознаки НАСКС: колоїдні зміни в клітинах, збільшення сорбції ними барвників, порушення гранулоутворення, вихід речовин, зміни метаболізму клітин, накопичення в них радикалів та ін. [1]. Мало вивчені порушення клітинного метаболізму цинку [2]. Цей метал є необхідною складовою частиною більшості металоензимів, стабілізує клітинні мембрани [3-10]. У деяких видах клітин, наприклад, нейтрофілів крові, акумулюється цинк, легко доступний для цитохімічного виявлення [11, 12]. У цій роботі за допомогою цитохімічних методів досліджувався вміст цинку в нейтрофілах при дії різних факторів і призначенні дієти, багатої цим металом. Для оцінки функціонального стану нейтрофілів використовували тест, оснований на постановці цитохімічної реакції метилового фіолетового (МФ).

Було обстежено 73 чоловіка. Серед них було 15 контрольних осіб (норма), котрі не зазнавали впливу досліджених факторів. 11 чоловік отримували багаторазове фізичне навантаження. 12 осіб зазнавали впливу хронічної алкоголізації, тобто регулярно та у великій кількості споживали алкоголь. 10 чоловік зазнавали дії на виробництві сірководню, а 13 чоловік – токсичних металів. Нарешті, були також обстежені 12 осіб, що працювали в гарячих цехах металургійних об’єктів, тобто, які находилися під впливом високої температури.

Перед забарвленням дитизоном і МФ мазки фіксували таким чином. У чашку Петрі наливали 20 мл формаліну. На її дно клали 2 скляних валика, поверх яких мазками униз ставили предметні стекла. Чашку закривали кришкою. Інкубацію мазків у висхідних парах формаліну проводили протягом 5 хв.

По закінченні терміну фіксації з чашки витягали мазки та фарбували. Для цього предметні стекла ставили мазками уверх в іншу чашку Петрі. На них за допомогою піпетки наливали робочий розчин барвника та чашку закривали кришкою. По закінченні терміну фарбування з чашки знімали кришку, з предметних стекол зливали розчин барвника.

У випадку з фарбуванням дитизоном використовували його 0,2%-ний водно-аміаковий розчин. Фарбування проводили протягом 3 годин.

Робочий розчин дитизону отримували шляхом п’ятикратного розведення дистильованою водою його основного розчину. Останній готували таким чином. У колбу з притертою кришкою наливали 70 мл дистильованої води та 0,6 мл 25%-ного розчину гідроокису амонію, висипали 400 мг дитизону. Суміш перемішували протягом 10 хв на водяній бані при +70 °С. Потім її фільтрували через беззольний фільтр. Фільтрат, що отримували, являв собою 1%-ний водно-аміаковий розчин дитизону, через те, що чверть наважки дитизону залишається нерозчиненою та знаходиться на фільтрі.

У випадку з забарвленням мазків метиловим фіолетовим використовували його 1%-ний водний розчин. Тривалість фарбування – 0,5 - 1 хв. Після промивання протягом 1 хв дистильованою водою мазки фарбували 1%-ним водним розчином флоксину. Тривалість фарбування – 5 – 10 хв. Промиті дистильованою водою протягом 5 хв мазки висушували на повітрі та досліджували під світловим мікроскопом з масляною імерсією.

На препаратах, забарвлених дитизоном, у цитоплазмі нейтрофілів виявлялась червона зернистість. При фарбуванні МФ зернистість приймала фіолетовий колір.

Для отримання цитохімічної реакції 8-ТСХ з цинком мазки обробляли протягом 1 хв 0,01%-ним ацетоновим розчином реагенту. Потім їх промивали дистильованою водою та досліджували під люмінесцентним мікроскопом.

Для збудження люмінесценції застосовували світлофільтр ФС-1, а як окулярний використовували світлофільтр із скла ЖС-18. На препаратах у цитоплазмі нейтрофілів виявлялися гранули з жовто-зеленою люмінесценцією.

Інтенсивність цитохімічних реакцій дитизону, 8-ТСХ і МФ оцінювали за трибальною системою: за один бал приймали слабопозитивну, два бали – помірну, три бали – виражену за інтенсивністю реакцію.

Для проведення морфологічних досліджень мазки крові фарбували по Романовському.

На препаратах у нейтрофілах важко було виявити порохувату зернистість фіолетового кольору. У базофілах знаходились рідкі грубі гранули синього кольору, які нашаровувались на ядра. Зернистість еозинофілів також крупна, але оранжевого кольору. Внаслідок нечіткості зернистості в нейтрофілах характер її змін в обстежених осіб не вдалося встановити.

При фарбуванні дитизоном червоні гранули виявлялись в усіх видах зернистості лейкоцитів. Середня інтенсивність реакції в нейтрофілах у контрольних осіб складала 1,3 ± 0,07. У мазках, флуорохромованих 8-ТСХ, у тих самих ділянках, що і при фарбуванні дитизоном, виявлялись гранули, що випромінювали жовто-зелене світло. Інтенсивність реакції у нейтрофілах складала 1,4 ± 0,11.

У осіб, що отримували багаторазове фізичне навантаження, інтенсивність реакції дитизону складала 0,9 ± 0,07 ($p < 0,001$), 8-ТСХ – 1,0 ± 0,08 ($p < 0,01$), МФ – 0,7 ± 0,06 ($p < 0,05$). При алкоголізації інтенсивність цих реакцій складала відповідно: 0,8 ± 0,09 ($p < 0,001$), 8-ТСХ – 0,8 ± 0,07 ($p < 0,001$), МФ – 0,6 ± 0,07 ($p < 0,01$). У осіб, що зазнали впливу сірководню, інтенсивність реакції дитизону складала 1,0 ± 0,08 ($p < 0,05$), 8-ТСХ – 0,9 ± 0,08 ($p < 0,01$), МФ – 0,6 ± 0,04 ($p < 0,01$). Подібні зміни викликали токсичні метали: 1,0 ± 0,1 ($p < 0,05$), 0,7 ± 0,09 ($p < 0,001$) і 0,5 ± 0,06 ($p < 0,001$) відповідно. У робітників гарячих цехів інтенсивність реакції дитизону складала 0,9 ± 0,06 ($p < 0,01$), 8-ТСХ – 1,0 ± 0,07 ($p < 0,01$), МФ – 0,7 ± 0,05 ($p < 0,05$).

Отримання дієти, багатої цинком, викликало деякі підвищення усіх показників. Цього було достатньо, щоб відміни від контролю стали несуттєвими ($p > 0,05$). Так, у осіб з фізичним навантаженням інтенсивність реакції дитизону складала 1,2 ± 0,11; 8-ТСХ – 1,3 ± 0,10; МФ – 1,0 ± 0,06. У алкоголізованих осіб одержані відповідно цифри 1,1 ± 0,09; 1,2 ± 0,11; 1,0 ± 0,10. У осіб, які зазнавали впливу сірководню, інтенсивність реакції дитизону складала 1,3 ± 0,10; 8-ТСХ – 1,3 ± 0,12; МФ – 0,9 ± 0,07. У випадках дії токсичних металів були отримані дані: 1,2 ± 0,12; 1,4 ± 0,10; 1,2 ± 0,11, а в робітників гарячих цехів металургійних об'єктів ці дані складали: 1,2 ± 0,13; 1,3 ± 0,09; 1,1 ± 0,10 відповідно.

При порівнянні даних досліджень стану цитохімічних реакцій у осіб, що отримували та не отримували дієти, багатої на цинк, була показана достовірність відмін інтенсивності цих реакцій.

Таким чином, дефіцит цинку в нейтрофілах стає несуттєвим у випадку з призначенням дієти, багатої на цей метал. Відновлення вмісту цинку в клітинах супроводжується нормалізацією їх специфічної функції, про що свідчить відновлення в них зернистості, яка виявляється фарбуванням МФ.

Схожість у розподілі в клітинах і у змінах в них зернистості, яка виявляється за допомогою дитизону та 8-ТСХ, говорить на користь ідентичності двох типів зернистості. 8-ТСХ був запропонований хіміками-аналітиками як високоселективний реагент на цинк. Специфічність реакції дитизону з цинком у нейтрофілах доводиться таким чином.

Попередня обробка мазків 0,1 М розчином етилендіамінтетраацетатом (ЕДТА), утворюючого з цинком непофарбований комплекс, упереджує отримання на них кольорової реакції дитизону. Пояснюється цей феномен тим, що ЕДТА володіє в порівнянні з дитизоном більш високою константою стабільності комплексу з цинком. Заблокований у клітинах цинк стає недоступним для взаємодії з дитизоном. Якщо ж за допомогою 0,1 М розчину ЕДТА оброблюються мазки, пофарбовані дитизоном, відбувається відщеплення цинку від комплексу з останнім, що супроводжується знебарвленням клітин.

Отримані дані можуть також бути використані для з'ясування фізіологічної ролі цинку у клітинах. За аналогією з панкреатичними клітинами В, де цинк, як гадають, знаходиться у комплексі з інсуліном ("депо-форма" гормону) [11, 13 - 16]. Можна вважати, що і у нейтрофілах цинк акумулюється в гранулах у вигляді комплексу з секреторним матеріалом. Мабуть, цинк приймає участь не тільки в механізмах секреції, але і в біосинтезі специфічного матеріалу клітин.

ЛІТЕРАТУРА

1. Браун А. Д., Моженок Т. П. Неспецифический адаптивный синдром клеточной системы. – Л.: Наука, 1987. - 232 с.

2. Малько М. М. Метаболізм цинку в клітинах при фізичних навантаженнях, іммобілізації та алкоголізації //Вісник ЗДУ. – 1998. - № 1. – С. 123 – 125.

3. Bettger W. J., O`Dell L. L. A critical physiological role of zinc in the structure and function of biomembranes //Life Sci. – 1981. – V. 28. – P. 1405 – 1438.

4. Valee B. L. Zinc: biochemistry, physiology and clinical pathology //Biofactors. – 1988. – V. 1. – P. 31 – 36.

5. Bray T., Bettger W. J. The physiological role of zinc as antioxidant //Free Radic. Biol. Med. – 1990. – V. 8. – P. 181 – 291.

6. Valee B. L., Auld D. S. Zinc coordination, function and structure of zinc enzymes and other proteins //Biochemistry. – 1990. – V. 19. – P. 5647 – 5659.

7. Crowder M. W., Maiti M. K., Banovic L., Makaroff C.A. Glyoxalase II from A. thaliana requires Zn(II) for catalytic activity //FEBS Left. – 1997. – V. 418. – P. 351 – 354.

8. Huang T. M., Hung H. C., Chang T. C., Chang G. G. Solvent kinetic isotope effects of human placental alkaline phosphatase in reverse micelles //Biochem. J. – 1998. – V. 330. – P. 267 – 275.

9. Nogales E., Wolf S. G., Downing K. H. Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography //Nature. – 1998. – V. 391. – P. 199 – 203.

10. Rigobello M. P., Callegaro M. T., Barzon E., Benetti M., Bindoli A. Purification of mitochondrial thioredoxin reductase and its involvement in the redox regulation of membrane permeability //Free Radic. Biol. Med. – 1998. – V. 24. – 370 – 376.

11. Ещенко В. А. Гистохимическое исследование цинка // Цитология. – 1978. - № 8. – С. 927 – 933.

12. Прохватилова А. В. Вивчення фізіологічної ролі цинку в клітинах // Вісник ЗДУ. – 1998. - № 1. – С. 144 – 146.

13. Aspinwall C. A., Brooks S. A., Kennedy R. T., Lakey J. R. Effects of intravesicular H+ and extracellular H+ and Zn2+ on insulin secretion in pancreatic beta cells //J. Biol. Chem. – 1997. – V. 272. – P. 31308 – 31314.

14. Huang S. T., Choi W. E., Bloom C., Leuenberger M., Dunn M. F. Carboxylate ions are strong allosteric ligands for the HisB10 sites of the R-state insulin hexamer //Biochemistry. – 1997. – V. 36. – P. 9878 – 9888.

15. Rahuel-Clermont S., French C. A., Kaarsholm N. C., Dunn M. F., Chou C. I. Mechanisms of stabilization of the insulin hexamer through allosteric ligand interactions // Biochemistry. – 1997 – V. 36. – P. 5837 – 5845.

16. Chausmer A. B. Zinc, insulin and diabetes //J. Am. Coll. Nutr. – 1998. – V. 17. – P. 109 – 115.