УДК 669.5:61

ПОРІВНЯЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ЦИНКУ В ГРАНУЛОЦИТАХ КРОВІ І ПАНКРЕАТИЧНИХ ОСТРІВЦЯХ

Омельянчик Л.О., Бовт В.Д., Єщенко В.А., Григорова Н.В., Фесенко Н.Р.

Загальною властивістю гранулоцитів та В-інсулоцитів є їх здібність вибірково забарвлюватись хелантами-хромофорами дитизоном і 8-(п-толуолсульфоніламіно)-хіноліном (8-ТСХ) завдяки акумулюванню в них цинку, що визначається цитохімічно [1-3]. Вважають, що в панкреатичних клітинах цинк секретується у вигляді комплексу з інсуліном («депо-форма» інсуліну)[1, 3, 4]. Можливо зробити припущення, що таку ж функцію цинк виконує в гранулоцитах крові. Для з'ясування цього питання нами було проведено порівняльне дослідження цинку в гранулоцитах крові та В-інсулоцитах тварин різного виду та віку, а також під час введення речовин, які змінюють функціональне становище даних клітин.

Вміст цинку в клітинах досліджували у 24 чоловік та 122 тварин (риб, ящірок, голубів, мишей). Вікові зміни цинку, що визначається цитохімічно, вивчались на мишах, тваринам цього виду також вводилися адреналін, який пригнічує секреторну активність клітин, і пілокарпін, який підсилює цю активність. Перший вводився внутрішньовнно у дозі 0,05 мг/кг, другий - підшкірно в кількості 1 мг/кг. Тварин забивали через 0,5 - 2 години після ін'єкції.

Кров у риб брали за допомогою пункції зябрової артерії, у ящірок і мишей - відсіканням кінчика хвоста, у голубів - шляхом пункції підкрильцевої вени.

Мазки крові фіксували в парах формаліну. Для цього їх поміщали на два валики у чашці Петрі, на дно якої наливали 20 мл формаліну. Чашку закривали кришкою. Інкубацію мазків у парах формаліну проводили протягом 5 хвилин. Потім з чашки знімали кришку, витягували мазки і переносили в другу чашку Петрі. На мазки за допомогою піпетки наливали робочий розчин дитизону, чашку накривали кришкою. Через 3 години кришку знімали, забарвлені дитизоном мазки промивали дистильованою водою та замикали в желатин. Для приготування робочого розчину дитизону розбавляли в 5 разів його основний розчин, який отримували таким чином. У колбочку з притертою пробкою наливали 45 мл дистильованої води, 0,9 мл 25%-ного розчину гідроокису амонію, висипали 600 мг дитизону. Суміш перемішували на водяній бані протягом 10 хвилин при 70°С. Потім розчин фільтрували через беззольний фільтр. Так як не весь дитизон розчинявся, то на фільтрі залишалось близько чверті його наважки. Це означає, що робочий розчин дитизону являє собою його 0,2%-ний водно-аміачний розчин.

На препаратах, що забарвлені дитизоном, у цитоплазмі зернистих лейкоцитів виявлялись червоні гранули. В окремій серії досліджень були отримані докази селективності цитохімічної реакції дитизону з цинком. Попередня обробка мазків 0,1 М розчином етилендіамінтетраацетату (ЕДТА) або 10% розчином діетилдитіокарбамату натрію (ДЕДТКН) запобігали отриманню кольорової реакції дитизону з цинком у гранулоцитах крові. Пояснюється цей феномен тим, що ЕДТА і ДЕДТКН утворюють з цинком не забарвлені комплекси та перешкоджують взаємодії дитизону з цим металом. Якщо мазки, що забарвлені дитизоном, обробити вказаними розчинами ЕДТА і ДЕДТКН, то відбудеться знебарвлення клітин внаслідок витіснення цими хелантами дитизону із його комплексу з цинком. Таким чином, цитохімічна реакція дитизону в гранулоцитах крові може бути використана для визначення в них цинку.

У забитих тварин брали шматочки підшлункової залози та фіксували в холодному ацетоні протягом 12 годин при 4°С. Потім шматочки витримували у двох ксилолах (по 15 хвилин у кожнім), суміші 50% ксилолу і 50% парафіну (протягом 30 хвилин при 37°С), інфільтрували при 56°С у двох рідких парафінах (по 1,5 години у кожнім) і заливали в парафін.

Парафінові зрізи товщиною 5-10мкм звільнювали від парафіну шляхом їхнього витримування у двох ксилолах (по 3 хвилини у кожнім). Потім зрізи проводили через 2 ацетони (по 3 хвилини в кожнім), 90°-ний, 80°-ний, 70°-ний ацетон (по 3 хвилини в кожнім), промивали протягом 5 хвилин у дистильованій воді. На депарафіновані зрізи наносили 0,05%-ний ацетоновий розчин 8-ТСХ, через 1 хвилину їх промивали протягом 5 хвилин у дистильованій воді і поміщали в желатин.

На препаратах у цитоплазмі В-інсулоцитів виявлялися гранули, які люмінесціювали жовто-зеленим світлом. Для збудження люмінесценції застосовували світлофільтр ФС-1, а як захисний ЖС-18.

8-ТСХ є високоселективним реагентом на цинк. В окремій серії досліджень було показано ідентичність гранул, які виявлялись у клітинах за допомогою дитизону і 8-ТСХ. Ці зерна були названі гранулами цинку. Інтенсивність цитохімічної реакції оцінювали за бальною системою: за один бал приймали слабопозитивну, два бали - помірну, три бали - виражену за інтенсивністю реакцію. При розрахунку 300 клітин у кожному випадку обчислювалась середня величина інтенсивності цитохімічної реакції. Ця величина служила показником вмісту цинку в клітинах у відносних (умовних) одиницях.

Вміст цинку в гранулоцитах крові у людей складав у середньому 1,3 ±0,1. Цю величину прийняли за контроль при порівнянні з іншими видами тварин. Найменша кількість цинку в указаних клітинах виявилась у риб (0,4 ± 0,06; $p < 0,001$). Потім у порядку зростання концентрацій цинку в гранулоцитах крові тварин можливо розташувати в такій послідовності: ящірки (0,5 ± 0,07; $p < 0,001$), голуби (0,7 ± 0,08; $p < 0,001$), миші (1,0 ± 0,09; $p < 0,01$). Ці дані вказують на те, що вміст цинку в гранулоцитах крові зростає по мірі підвищення рівня еволюційного розвитку тварин.

Подібна закономірність простежувалась при дослідженні панкреатичних клітин вказаних тварин. У риб у підшлунковій залозі не вдалося виявити клітин, які вміщують цинк, що визначається цитохімічно (тільця Брокмана у розрахунок не приймаються). Цинку в В-інсулоцитах визначалось у ящірок 0,5 ±0,09 ($p<0,001$), голубів - 0,6±0,08 ($p < 0,001$), мишей - 1,9 ±0,14 ($p>0,05$). Контролем служили панкреатичні клітини В людей (1,9 ± 0,16).

Вище були наведені дані вмісту цинку в гранулоцитах крові (дорослих, статевозрілих) мишей. У статевонезрілих і старих тварин концентрація цинку в цих клітинах складала відповідно 0,7 ± 0,06 ($p < 0,05$) і 0,7 ± 0,08 ($p > 0,05$). Ці дані вказують на відносний дефіцит цинку в гранулоцитах крові в статевонезрілих і старих тварин. Те ж саме спостерігалось при дослідженні панкреатичних клітин В. Дані вмісту цинку в цих клітинах у контрольних мишей приведені вище. Кількість цинку в статевозрілих складала 1,4 ±0,11 ($p < 0,01$), а в старих мишей - 1,5 ± 0,12 ($p <0,05$).

Дефіцит цинку в клітинах у статевонезрілих тварин можна пояснити його підвищеними витратами на процеси росту та розвитку організму, а в старих тварин - зниженням процесів асиміляції в організмі.

У мишей, що отримали адреналін, вміст цинку в гранулоцитах крові був підвищеним (1,4±0,12; $p<0,05$). Зворотні відносини (зниження вмісту цинку в цих клітинах) відмічались після ін'єкції пілокарпіну (0,6±0,07; $p<0,01$). Аналогічні порушення спостерігались у В-інсулоцитах: адреналін викликав підвищення (2,4±0,16; $p<0,05$), а пілокарпін - зменшення вмісту в них цинку (1,2+0,14; $p <0,01$).

Таким чином, вміст цинку в клітинах може характеризувати їхнє функціональне становище: зниження секреторної активності супроводжується накопичуванням цинку в клітинах, а підсилення цієї активності пов'язано з витратою цинку клітинами.

Результати досліджень підтверджують положення про роль цинку у функції клітин ентеро-інсулярної та імунної систем організму [1 - 6].

ЛІТЕРАТУРА

1. Ещенко В. А. Гистохимическое исследование цинка //Цитология. - 1978. - № 8. - С. 927-933.
2. Малько М. М. Метаболізм цинку в клітинах при фізичних навантаженнях, іммобілізації та алкоголізації //Вісник ЗДУ. – 1998. - № 1. – С. 123-125.
3. Прохватилова А.В. Вивчення фізіологічної ролі цинку в клітинах //Вісник ЗДУ. – 1998. - № 1. – С. 144-146.
4. Thurnham D. J. //J. Clin. Pathol. - 1997. - V. 50. - P. 887 - 891.
5. Lindahe M., Leanderson P., Tagesson C. //Hum. Exp. Toxicol. - 1998. - V. 17. - P. 105-110.
6. Chausmer A. B.// J. Am. Coll. Nutr. - 1998. - V. 17. - P. 109-115.