УДК 669.5:61

МОДЕЛЮВАННЯ ГІПОФУНКЦІЇ ОРГАНІВ ЗА ДОПОМОГОЮ ДИТИЗОНУ

Омельянчик Л.О., Єщенко В.А., Бовт В.Д., Кучковський О.М., Прохватилова А.В., Григорова Н.В

Цинк виконує в організмі різноманітні функції. Він, зокрема, необхідний для активності ряду ферментів, стабілізує клітинні мембрани [1-10]. Зв'язування цього металу хелатуючими агентами, наприклад дитизоном, повинно привести до порушень структури та функції клітин. У цій роботі проводились дослідження впливу дитизону на функціональний стан нейронів гіпокампу, клітин панкреатичних острівців (інсулоцитів), базальних відділів кишкових крипт (клітин Панету), кінцевих відділів передміхурової залози.

Про функціональний стан нейронів гіпокампу можна судити за змінами в поведінці, інсулярного апарату - за змінами цукру в крові та специфічної зернистості, що виявляється в клітинах В острівців за допомогою альдегідфуксину. Вміст специфічної зернистості в клітинах Панету, певно, також може бути використаний як функціональний тест. Що стосується передміхурової залози, то про аналогічні тести для кінцевих відділів невідомо.

Вміст цинку в клітинах, що виявлений забарвленням зрізів дитизоном і 8-(п-толуолсульфоніламіно)-хіноліном (8-ТСХ), може служити високоселективним індикатором їхнього функціонального стану [10]. Ці реакції нами були використані для вивчення впливу дитизону на нейрони гіпокампу, інсулоцити, клітини Панету, та кінцеві відділи передміхурової залози.

У дослідах було використано 111 тварин (миші, щурі). Дитизон уводили тваринам внутрішньочеревинно у дозі 50-100 мг/кг. Кров брали з хвоста для визначення впливу та виготовлення мазків. Забивали тварин через 30 хв, 1-5 діб після ін'єкції. Тканину головного мозку використовували для отримання цитохімічної реакції на цинк у свіжоприготованих зрізах завтовшки 60-70 мкм, а також для фіксації в рідині Буену.

Шматочки підшлункової залози фіксували у холодному ацетоні, нейтральному формаліні, у рідині Буену і доводили до парафіну. Парафінові зрізи готували завтовшки 5-10 мкм. Забарвлювали 0,2 %-ним водно-аміачним розчином дитизону та 0,01%-ним ацетоновим розчином 8-ТСХ (для визначення цинку в клітинах), альдегідфуксином (для визначення зернистості інсулінпродукуючих клітин), гематоксилін-флоксином (для дослідження структури клітин та виявлення оксифільної зернистості А-інсулоцитів і клітин Панету.

Основний розчин дитизону, що використовувався для ін'єкцій тваринам, готували таким чином. У колбу з притертою кришкою наливали 45 мл дистильованої води та 0,9 мл 25%-ного розчину гідроокису амонію, добавляли 600 мг дитизону. Суміш перемішували протягом 10 хв на водяній бані, потім фільтрували через беззольний фільтр. Так як приблизно чверть наважки дитизону залишалось на фільтрі, то одержували 1%-ний водно-аміачний розчин дитизону, який використовувався для ін'єкцій. Для забарвлення зрізів вказаний розчин розбавляли в 5 разів дистильованою водою.

Забарвлення депарафінованих зрізів розчином дитизону проводили протягом 3 год, а розчином 8-ТСХ - протягом 1 хв. Промиті дистильованою водою зрізи поміщали в гліцерин-желатин у випадку забарвлення дитизоном і в гліцерин після забарвлення 8-ТСХ. У першому випадку мікроскопували у темному та світлому полях, у другому - у відбитому ультрафіолеті (світлофільтри ФС-1 і ЖС-18).

На препаратах, що забарвлені дитизоном, в цитоплазмі клітин виявлялись пурпурно-червоні гранули які в темному полі "світилися" рожево-червоним світлом. На зрізах, що оброблені 8-ТСХ, ці гранули люмінесціювали жовто-зеленим світлом.

В окремих серіях досліджень показана подібна локалізація в клітинах дитизонової та люмінесцентної зернистості. Ці дані можуть бути використані як один з доказів ідентичності двох типів зернистості та селективності дитизонової реакції з цинком (8-ТСХ є високоселективним реагентом на цинк).

При забарвленні зрізів підшлункової залози альдегідфуксином в цитоплазмі В-інсулоцитів виявлялась синьо-фіолетова зернистість, кількість якої служило показником вмісту в клітинах гормону інсуліну. Гематоксилін-флоксиновим методом в цитоплазмі панкреатичних клітин А виявлялась червона зернистість, вміст якої може служити показником кількості в них гормону глюкогону. В клітинах Панету

тонкої кишки виявлялась такого ж кольору зернистість, яка, певно, вказує на вміст в них глюкогонподібної речовини. Флоксинофільні гранули в клітинах Панету великі та настільки добре видні, що можна підрахувати їх кількість в клітинах.

Після уведення дитизону тварини застигали на місці. Якщо їх підштовхнути, вони пересувались на деяку відстань і знову застигали. При цьому в гіпокампі розвивалась інтравітальна реакція дитизону з цинком, яка виявлялась за його червоним забарвленням. Коли таке забарвлення зникало, тварини виходили із вказаного стану, що супроводжувалось відновленням вмісту цинку в гіпокампі.

Можна думати, що зміни в поведінці тварин обумовлені зв'язуванням дитизоном цинку в гіпокампі. Цей реагент може застосовуватися для моделювання стану, що нагадує катотонічний ступор у хворих на шизофренію.

Дитизон викликав зміни глікемії, які у мишей більш виражені, чим у щурів. Якщо у контрольних мишей середній рівень цукру в крові складав 6,3±0,42 ммоль/л, то після ін'єкції реагенту він складав 9,1±0,53 ($p < 0,01$). Ці зміни супроводжувались зниженням вмісту в клітинах В острівців альдегідфуксинофільної зернистості та гранул цинку, що виявлені 8-ТСХ. Так у контрольних мишей інтенсивність реакції альдегідфуксину складала 1,2±0,11, а у дитизонових тварин - 0,5±0,06 ($p < 0,001$). Реакція 8-ТСХ відповідно складала 2,0±0,16 і 0,7±0,08 ($p < 0,001$).

Таким чином миші виявились більш зручними, ніж щурі, видом тварин для моделювання діабету за допомогою дитизону.

Зміни в клітинах Панету та епітелію кінцевих відділів передміхурової залози у щурів більш виражені, ніж у мишей.

У контрольних щурів інтенсивність реакції дитизону в клітинах Панету складала 1,9±0,13, а реакція 8-ТСХ - 2,2±0,16. Після уведення дитизону ці реакції складали відповідно 0,8±0,07 ($p < 0,001$) і 0,9±0,08 ($p < 0,001$). Ці дані вказують на розвиток дефіциту цинку в клітинах Панету у дитизонових тварин. Такі ж зміни клітин прослідкувались при забарвлені гематоксилін-флоксином. Інтенсивність флоксинової реакції та кількість гранул флоксину у дитизонових тварин були нижче, ніж у контрольних.

Дефіцит цинку після уведення дитизону також прослідкувався в епітелію кінцевих відділів передміхурової залози. Так, у контрольних щурів інтенсивність реакції дитизону в цих клітинах складала 1,6±0,15, а реакції 8-ТСХ - 1,8±0,16. Після ін'єкції дитизону ці реакції складали відповідно 1,0±0,09 ($p < 0,01$) і 1,1±0,10 ($p < 0,001$).

Таким чином, щурі є більш зручним видом тварин для моделювання недостатності клітин епітелію кінцевих відділів передміхурової залози за допомогою дитизону.

Зміни, що описані вище, які говорять про порушення функцій клітин, пов'язані з морфологічними змінами в них, що викликаються дитизоном. У виражених випадках розвивались некроз клітин і атрофія органу.

Отримані дані являють інтерес з точки зору використання дитизону для моделювання стану гіпофункції органів. Ці дані можуть бути також використані для з'ясування функціональної ролі цинку. Зокрема, вони підкріплюють положення про стабілізуючу дію іонів цинку на клітинні мембрани. Зв'язуючи цей метал, дитизон позбавляє його можливості стабілізувати клітинні мембрани, в результаті чого підвищується проникність цих структур, розвиваються їх декомпартменталізація та загибель клітин.

ЛІТЕРАТУРА

1. Bettger W. J., O'Dell L. L. //Life Sci. - 1981. - V. 28. - P. 1405-1438.
2. Valee B. T. //Biofactors. - 1988. - V. 1. - P. 31-36.
3. Cobo J. M., Garcia Canero R., Valdez J. C. et al. //J. Cell. Physiol. - 1997. - V. 175. - P. 59-67.
4. Huang T. M., Hung H. C., Chang T. C. //Biochem. J. - 1998. - V. 330. - P. 267-275.
5. Nogales E., Wolf S. G., Downing K. H. // Nature. - 1998. - V. 391. - P. 199-203.
6. Pattison S. E., Talees S., Stowell C. et al. //Arch. Biochem. Biophys. - 1998. - V. 351. - P. 41-46.
7. Rigobello M. P., Callegaro M. T., Barzon E. et al. //Free Radic. Biol. Med. - 1998. - V. 24. - P. 370-376.
8. Song M. K., Rosenthal M. J., Naliboff B. D. et al. //Metabolism. - 1998. - V. 47. - P. 39-43.
9. Vignolini F., Nobili F., Mengheri E. // Life Sci. - 1998. - V. 62. - P. 131-141.
10. Ещенко В. А. //Цитология. - 1978. - Т. 20. - С. 927-933.