УДК 616.379

ВИВЧЕННЯ ФІЗІОЛОГІЧНОЇ РОЛІ ЦИНКУ В КЛІТИНАХ

Прохватілова А.В.

Широке розповсюдження цинку в організмі пояснюється його важливими біологічними функціями /1 – 4/ Він є необхідною складовою частиною більшості металоензимів і підтримує інтегральну структуру та функцію біомембран /5-9/. Однак фізіологічна роль цинку в клітинах вивчена недостатньо. Для рішення цього питання нами були використані високочутливі цитохімічні методи визначення цинку, основані на застосуванні хелантів-хромофорів дитизону та 8-/п-толуолсульфоніламіно/-хіноліну /8-ТСХ / /10, II /.

Досліди були проведені у 12 чоловік і на 36 мишах. Матеріалом цитохімічних дослідів були мазки периферичної крові, шматочки підшлункової залози і кишечника.Перед забарвленням дитизоном мазки крові фіксували в парах формаліну на протязі 5 хвилин. Потім мазки витримували на протязі 3 годин в 0,2%-ному водно-аміачному розчині дитизону, промивали дистильованою водою, клали у желатин і досліджували у світловому мікроскопі з масляною імерсією.

Високоселективну цитохімічну реакцію 8-ТСХ з цинком в мазках крові отримували шляхом їх обробки на протязі 1 хвилини 0.01%-ним ацетоновим розчином даного реагенту. При цьому відбувалась одночасна фіксація та забарвлення клітин. Потім мазки промивали дистильованою водою, підсушували на повітрі та досліджували під люмінесцентним мікроскопом з використанням імерсійного масла. Для збудження люмінесценції використовували світлофільтр ФС-1, а як захисний /окулярний, запираючий/ використовували світлофільтр ЖС-18.

Для проведення люмінесцентної реакції 8-ТСХ в клітинах інших тканин використовували парафінові зрізи тканин,фіксованих у холодному ацетоні. Депарафіновані зрізи флуорохромували 8-ТСХ і досліджували під люмінесцентним мікроскопом, як описано вище з мазками крові.

Стан інсулярного апарату підшлункової залози оцінювали визначенням глікемії по Хагедорну-Йенсену та забарвленням депарафінованих зрізів цього органу альдегідфуксином, виявляючим в панкреатичних клітинах В гормон інсулін /10 /. У цьому випадку шматочки залози фіксували на протязі 1 доби в рідині Буена,потім через серію спиртів зростаючої концентрації та ксилоли доводили до парафіну. Виявлення специфічних /оксифільних / гранул клітин Панета вимагало використання як фіксатора нейтрального формаліну. Депарафіновані зрізи забарвлювали розчином флоксину.

Інтенсивність цитохімічних реакцій /дитизона, 8-ТСХ, альдегідфуксину, флоксину / оцінювали за трибальною системою: одним балом позначали слабопозитивну, двома – помірну, трьома балами - виражену по інтенсивності реакцію. На підставі підрахунку на 100 клітинах встановлювали середнє значення інтенсивности реакції.

Продукт цитохімічної реакції дитизону виявляється у цитоплазмі клітин у вигляді червоних гранул. На препаратах, флуорохромованих 8-ТСХ, в тих же ділянках клітин виявлялись гранули, люмінесціюючі жовто-зеленим світлом. 0бидва типи зернистості мали схожість не тільки по розподілу в клітинах, але й по змінах вмісту гранул в цитоплазмі при різних експериментальних впливах.

В іншій серії дослідів використовували попередню, перед забарвленням дитизоном, обробку препаратів 0,1 М-им розчином етилендіамінтетроацетату /ЕДТА/. Останній утворює з цинком незабарвлений комплекс. Блокуючи цей метал, ЕДТА запобігає отриманню кольорової реакції дитизону з цинком в клітинах. Такі результати можуть бути підтвердженням специфічності цитохімічної реакції дитизону з цинком.

На препаратах підшлункової залози, забарвлених альдегідфуксином, в цитоплазмі В-інсулоцитів виявляється синьо-фіолетова зернистість, вміст якої служить показником кількості в клітинах інсуліну. В окремій серії дослідів ми порівняли розподіл в клітинах В-острівців гранул цинку та інсуліну і встановили подібну їх локалізацію.

На препаратах тонкої кишки, забарвлених флоксином, в цитоплазмі клітин Панета виявлялися червоні гранули. По розподілу в цитоплазмі цих клітин вони нагадували гранули цинку.

0тримані дані можуть служити підкріпленням гіпотези про участь цитохімічно визначаємого цинку в здійсненні клітинами їх специфічної /секреторної / функції /10 /. Необхідно було також прослідкувати, як змінюється вміст цинку під час експериментальних впливів, змінюючих функціональний стан клітин.

Введення тваринам пілокарпіну посилює секреторну активність клітин, а голодування та введення адреналіну, навпаки, пригнічують цю активність. У випадку з інсулопродукуючими клітинами /ІПК / мали інтерес досліди з введенням глюкози, специфічного стимулятора секреції інсуліну, та алоксану, викликаючого розвиток діабету внаслідок пошкодження цих клітин. У таблиці наведені результати дослідів впливу голодування та вказаних речовин на інсулярний апарат у мишей.

Таблиця - Глікемія, інтенсивність реакції альдегідфуксину та 8-ТСХ в інсулінпродукуючих клітинах у мишей при голодуванні та введенні речовин.

Група тварин	Кількість тварин	Цукор крові, ммоль/л	Інтенсивність реакції	
			альдегідфуксину	8-ТСХ
Контроль	14			
$\overline{X}$		6.5	1.3	2.1
м		0.41	0.10	0.15
Голодування	12			
$\overline{X}$		4.8	1.6	2.6
м		0.26	0.07	0.14
p		<0.05	<0.05	<0.05
Навантаження глюкозою	11			
$\overline{X}$		17.3	1.0	1.4
м		2.05	0.10	0.11
p		<0.001	<0.05	<0.001
Алоксан	12			
$\overline{X}$		16.5	0.2	0.4
м		1.09	0.06	0.6
p		<0.001	<0.05	<0.001
Адреналін	12			
$\overline{X}$		2.1	1.7	2.6
м		1.38	0.13	0.18
p		<0.001	<0.01	<0.05
Пілокарпін	13			
$\overline{X}$		4.7	0.8	1.5
м		0.25	0.09	0.12
p		<0.05	<0.01	<0.01

При голодуванні тварин і введенні їм адреналіну вміст інсуліну та цинку в ІПК підвищений, так як пригнічувалась секреторна функція цих клітин. Зворотні відношення спостерігалися при введенні тваринам глюкози та пілокарпіну: посилення вказаної функції клітин супроводжувалось зниженням вмісту в них двох компонентів. Введення діабетогенного агента алоксану приводило до дефіциту цинку та інсуліну в ІПК.Голодування та введення адреналіну викликали накопичення цинку також в гранулоцитах крові та клітинах Панета, а після ін'єкції пілокарпіну, вміст цього металу в даних клітинах, навпаки,понижувався.Зміни кількості гранул, що виявляються при забарвленні клітин Панета флоксином і 8-ТСХ, були подібними у всіх випадках.

Таким чином, дослідження різних видів клітин приводять до загального висновку про те, що пригнічення секреторної активності клітин викликає накопичення в них цинку, а посилення цієї активності - зменшення вмісту даного металу в клітинах.

Розроблені досліди вносять певний внесок як у зв'язування фізіологічної ролі цинку в клітинах, так і у виявлення функціональних взаємовідносин між клітинами, акумулюючими цитохімічно визначаємий цинк.

ЛІТЕРАТУРА

1.Войнар А.И. Биологическая роль микроэлементов в организме животных и человека. - М.: Высшая школа, 1960.

2.Коломийцева М.Г., Габович Р.Д. Микроэлементозы в медицине. - М.: Медицина, 1970.

3. / Williams D. / Уильямс Д. Металлы жизни. – М.: Мир, 1975.

4. / Albert A./ Альберт Э. Избирательная токсичность. –М.: Мир, 1989.

5.Bettger W. J.,O'Dell L.L. // Life Sci. 1981.-V.28. P.1405 – 1438.

6. Vallee B.L.//Biofactors. – 1988.-V.I. –P.31-36.

7. Bray T., Better W.J. //Free Radic. Biol. Med.- 1990.- V.8.-P/281-291

8. Prasad A. S. //Nutrition. - 1995. - V. II, I Suppl. -P. 93 - 99.

9. Sandstead H.H. // Nutrition . - 1995. - V. II, I Suppl –P. 87-92.

10. Ещенко В.А. // Цитология.-1978.-Т.20, №8. –С.927-933.

11. Омельянчик Л.А., Ещенко В.А., Бовт В.Д. и др. //Вопросы биоиндикации. - Запорожье: Изд-во ЗГУ, 1997. - С. 184 -187..