УДК 669.5:61

ВПЛИВ ГІПЕРГЛІКЕМІЗУЮЧИХ ФАКТОРІВ НА ВМІСТ ЦИНКУ В КЛІТИНАХ

Бовт В.Д., д.б.н., професор, Єщенко Ю.В., аспірант, Григорова Н.В., к.б.н., ст.викладач

Запорізький державний університет

Уведення гіперглікемізуючих факторів викликає зниження вмісту цинку в клітинах. Ступінь вираженості цих змін залежить від важкості діабету.

Ключові слова: глікемія, діабет, інсулін, інсулоцити, клітини Панета, передміхурова залоза, цинк.

Бовт В.Д., Ещенко Ю.В., Григорова Н.В. ВЛИЯНИЕ ГИПЕРГЛИКЕМИЗИРУЮЩИХ ФАКТОРОВ НА СОДЕРЖАНИЕ ЦИНКА В КЛЕТКАХ / Запорожский государственный университет, Украина

Введение гипергликемизирующих факторов вызывает снижение содержания цинка в клетках. Степень выраженности этих изменений зависит от тяжести диабета.

Ключевые слова: гликемия, диабет, инсулин,инсулоциты, клетки Панета, предстательная железа, цинк.

Bovt V.D., Eshchenko J.V., Grigorova N.V. THE INFLUENCE OF HYPERGLYCAEMIZING FACTORS ON ZINC CONTENT IN THE CELLS / Zaporizhzhya State University, Ukraine

Injection of hyperglycaemizing factors induces the decrease of zinc content in the cells. The expressiveness degree of these changes was dependent from the diabetes severity.

Key words: glycaemia, diabetes, insulin, insulinocytes, paneth cells, prostate, zinc.

1. ВСТУП

До гіперглікемізуючих факторів можуть бути віднесені алоксан, дитизон, 8 - (п - толуолсульфоніламіно) – хінолін (8-ТСХ) [1]. У мишей найбільш виражену дію має алоксан: у більшості випадків спостерігається висока глікемія як результат вираженого пошкодження інсулінпродукуючих клітин [1, 2]. Із зазначених реагенттів найменшу дію має 8-ТСХ: гіперглікемія невисока і, як правило, носить минущий характер. У багатьох тварин розвивається прихований діабет, який характеризується нормальним вмістом цукру в крові та незначними змінами в острівцях [1, 2]. Проміжне положення займає дитизон, який у більшості випадків викликає легкий діабет зі слабою гіперглікемією та легким пошкодженням у панкреатичних клітинах В [1, 2].

Алоксан є інгибитором тіолових груп ферментів. Дитизон і 8-ТСХ – хелатуючі агенти, які здібні зв'язувати іони цинку та інших металів [1]. Очевидно, що механізм діабетогенної дії першого відрізняється від механізму дії двох інших агентів. Представляє інтерес порівняння характеру змін вмісту цинку в клітинах при уведенні зазначених речовин. Дані, які є в літературі [2-4, 7-10], недостатні для вирішення цього питання.

2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У дослідах було використано 59 мишей. Контролем служили інтактні тварини. Алоксан уводили мишам підшкірно в дозі 400 мг/кг у вигляді 2% - ного розчину. Дитизон уводили внутрішньочеревно в кількості 100 мг/кг у вигляді 1%-ного водно-аміачного розчину. Внутрішньочеревні ін'єкції 8-ТСХ робили в дозі 50 мг/кг у вигляді 0,5%-ного розчину на 0,1н розчині гідроксиду натрію.

Розчин дитизону для ін'єкції готували таким чином. У скляночку з притертою пробкою наливали 30 мл дистильованої води, додавали 400 мг дитизону та 0,6 мл 25%-ного розчину гідроксиду амонію. Суміш перемішували на водяній бані при 70˚С протягом 10 хв, потім фільтрували через беззольний фільтр. Отриманий фільтрат являв собою 1%-ний водно-аміачний розчин дитизону, оскільки на фільтрі залишалась чверть наважки реагенту.

Рівень цукру в крові визначали за Хаггедорном-Йенсеном. Цей метод виявився найбільш зручним, оскільки за його допомогою виконана більшість робіт щодо вивчення діабетогенної дії різних речовин.

Для оцінки функціонального стану інсулярного апарату дані глікемії підкріплювали визначенням інсуліну в підшлунковій залозі за допомогою забарвлення її зрізів альдегідфуксином. Найкращим фіксаторром слугувала рідина Буена – суміш розчинів пікринової кислоти, нейтрального формаліну та оцтової кислоти. Тривалість фіксації – 1 доба. Потім шматочки підшлункової залози витримували у 70˚-ному спирті протягом 4 год, 80˚-ному – 4 год, 90˚-ному – 4 год, абсолютному – 4 год. Проводили послідовну обробку в двох ксилолах (по 15 хв у кожнім). Потім шматочки витримували в каші при 37˚С

протягом 30 хв. Каша являє собою суміш 50% парафіну та 50% ксилолу. Потім шматочки інфільтрували шляхом витримування їх у двох рідких парафінах (по 1,5 год у кожнім при 56˚С). Потім шматочки заливали парафіном. Отримані таким чином блоки використовували для приготування парафінових зрізів завтовшки 5 мкм.

Депарафінування зрізів проводили у двох порціях ксилолу (по 3 хв у кожній) з наступною обробкою їх у спиртах падаючої концентрації (абсолютнім, 90˚-нім, 80˚-нім, 70˚-нім – по 3 хв у кожнім). Далі відбувалось промивання в дистильованій воді (5 хв).

Потім зрізи послідовно витримували в окислювачі (до їх порудіння) і у відновлювачі (до їх знебарвлення). Окислювач готували шляхом перемішування 1 частини 2,5%-ного розчину перманганату калію, 1 частини 5%-ного розчину сірчаної кислоти і 4 частин дистильованої води. За відновлювач використовували 2%-ний розчин щавлевої кислоти. Потім зрізи промивали протягом 5 хв у дистильованій води і забарвлювали 0,25%-ним розчином альдегідфуксину на 70˚-ному спирті. Тривалість забарвлення – 6 хв. Оброблені в підкисленому спирті зрізи промивали в дистильованій воді і замикали в гліцерин-желатин. На препаратах у панкреатичних клітинах В виявлялась синьо-фіолетова зернистість – показник вмісту в них гормону інсуліну.

Цитохімічні дослідження цинку проводили в клітинах панкреатичних острівців, базальних відділів кишкових крипт (клітинах Панета), кінцевих відділів передміхурової залози.

Для цитохімічного визначення цинку на парафінових зрізах завтовшки 5-10 мкм застосували фіксацію шматочків тканини у холодному (4˚С) ацетоні. Тривалість фіксації – 12 год. Потім шматочки проводили крізь ксилоли, кашу та рідкі парафіни, як описано вище у випадку з фіксацією в рідині Буена.

Депарафінування зрізів проводили шляхом їх витримування у двох ксилолах і двох спиртах (по 3 хв у кожнім). Потім зрізи обробляли протягом 1 хв 0,01%-ним ацетоновим розчином 8-ТСХ, промивали протягом 5 хв у дистильованій воді, замикали в гліцерин і вивчали під люмінесцентним мікроскопом.

Для збудження люмінесценції застосували світлофільтр ФС-1, як захисний (окулярний, запираючий) використовували світлофільтр зі скла ЖС-18.

На препаратах у цитоплазмі клітин виявлялись гранули, які люмінесціювали жовто-зеленим світлом. Кількість зернистості в клітинах – показник вмісту в них цинку.

Інтенсивність цитохімічних реакцій альдегідфуксину та 8-ТСХ оцінювали за бальною системою, запропонованою В.В. Соколовським [5] і Ф.Г.Дж.Хейхоу та Д.Квагліно [6]. За один бал приймали слабо позитивну, два бали – помірну, три бали – виражену за інтенсивністю реакцію. На підставі підрахунку в 100 клітинах обчислювали середню арифметичну величину ($\overline{X}$) та похибку (m). За таблицею Стьюдента визначали показник достовірності (р).

3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У контрольних (інтактних) мишей середній рівень цукру в крові складав 6,3 ± 0,24 ммоль/л (табл.). При уведенні алоксану глікемія дорівнювала 14,2 ± 0,95 ммоль/л (в 2,3 рази вище за норму, $p < 0,001$). Дитизон мав менш виражену гіперглікемізуючу дію (9,8 ± 0,46 ммоль/л – в 1,6 разу вище за норму, $p < 0,001$). Ще слабіша була дія 8-ТСХ (7,4 ± 0,62 ммоль/л – в 1,2 разу вище за норму, $p > 0,05$). Ці дані вказують на те, що алоксан викликав розвиток у мишей діабету середньої важкості, при уведенні дитизону виникал легкий, а 8-ТСХ – прихований діабет.

Інтенсивність цитохімічної реакції 8-ТСХ в острівцях у нормі складала 2,0 ± 0,13 (таблиця 1). При уведенні алоксану вміст цинку в інсулоцитах скорочувався на 55% (0,9 ± 0,08; $p < 0,001$). Менш виражений дефіцит цинку в клітинах панкреатичних острівців був при уведенні дитизону (1,2 ± 0,09 – на 40% менше за норму, $p < 0,001$). Найменшу дію мав 8-ТСХ (1,4 ± 0,10 – на 30% нижче за норму, $p < 0,001$).

Такі ж зміни прослідковувались при дослідженні вмісту інсуліну в панкреатичних клітинах В (табл.). У контрольних мишей інтенсивність цитохімічної реакції альдегідфуксину складала в середньому 1,3 ± 0,11. Алоксан викликав зниження вмісту інсуліну в панкреатичних клітинах В на 62% (0,5 ± 0,04; $p < 0,001$), дитизон – на 38% (0,8 ± 0,07; $p < 0,001$), 8-ТСХ – на 23% (1,0 ± 0,06; $p < 0,05$).

Таким чином, стає очевидним, що вміст цинку та інсуліну в панкреатичних клітинах В знижується при уведенні діабетогенних речовин. Чим важче був діабет, тим сильніші були зміни в острівцях. Дефіцит цинку та інсуліну прослідковувався навіть у відсутність гіперглікемії (у мишей, отримавших 8-ТСХ). Ці дані можуть слугувати підтвердженням того, що 8-ТСХ викликає прихований діабет. Отже, про наявність діабету можна судити не тільки на підставі аналізу глікемії, але і при визначенні вмісту цинку та інсуліну в панкреатичних клітинах В.

У контрольних мишей інтенсивність цитохімічної реакції 8-ТСХ у клітинах Панета складала в середньому 0,9 ± 0,07. При уведенні алоксану вміст цинку в цих клітинах знижувався на 56% (0,4 ± 0,05; $p < 0,001$). Дитизон викликав менш виражені зміни (0,7 ± 0,06 – на 22% нижче за норму, $p < 0,05$). Найменшу дію на ці клітини мав 8-ТСХ (0,8 ± 0,08 – на 11% менше за норму, $p > 0,05$).

Дані таких досліджень вказують на розвиток дефіциту цинку в клітинах Панета при уведенні алоксану і дитизону, у той час як 8-ТСХ не викликав суттєвих змін кількості в цих клітинах даного металу. Отже, дефіцит цинку в клітинах Панета може бути результатом розвитку інсулінової недостатності.

У клітинах епітелію кінцевих відділів передміхурової залози мишей визначалось 1,3 ± 0,12 цинку. При уведенні алоксану ця цифра знижувалась на 54% (0,6 ± 0,05; $p < 0,001$). Дитизон викликав менш виражені зміни (0,7 ± 0,08 – на 46% менше за норму, $p < 0,001$). Як і у випадку з клітинами Панета, вміст цинку в клітинах передміхурової залози при уведенні 8-ТСХ не відрізнявся від контрольних величин (1,1 ± 0,11 – на 15% нижче за норму, $p > 0,05$). Ці дані також приводять до висновку про те, що інсулінова недостатність може бути причиною дефіциту цинку в клітинах.

Таким чином, 8-ТСХ викликав достовірне зниження вмісту цинку в панкреатичних клітинах В, що вказує на розвиток прихованого діабету, який характеризується змінами в цих клітинах у відсутність гіперглікемії, тобто у відсутність інсулінової недостатності. У других видах клітин вміст цинку суттєво не змінювався, мабуть, як результат відсутності інсулінової недостатності.

Такий висновок підкріплюється результатами досліджень впливу алоксану та дитизону на клітини. У результаті розвитку інсулінової недостатності, про що свідчить гіперглікемія, вміст цинку знижувався у всіх досліджених видах клітин. Чим вище був рівень цукру в крові, тим сильніше був дефіцит цинку в клітинах.

Таблиця 1. - Рівень цукру в крові, інтенсивність цитохімічних реакцій 8-ТСХ та альдегідфуксину в панкреатичних острівцях у мишей при уведенні діабетогенних хелантів ($\overline{X} \pm m$).

Група тварин	Кількість цукру в крові, ммоль/л	Інтенсивність реакції, ум. од.	
		8-ТСХ	альдегідфуксину
Інтактні тварини (n =17)	6,3 ± 0,24	2,0 ± 0,13	1,3 ± 0,11
Тварини, яким уводили дитизон (n = 15)	9,8 ± 0,46***	1,2 ± 0,09***	0,8 ± 0,07***
Тварини, яким уводили 8-ТСХ (n = 13)	7,4 ± 0,62	1,4 ± 0,10***	1,0 ± 0,06*
Тварини, яким уводили алоксан (n =14)	14,2 ± 0,95***	0,9 ± 0,08***	0,5 ± 0,04***

Примітка: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$ –достовірність різниці в порівнянні з контролем.

4. ВИСНОВКИ

Уведення мишам алоксану викликає розвиток діабету середньої важкості з вираженим дефіцитом цинку в клітинах.

Дитизон викликає легкий діабет і нерізко виражене зниження вмісту цинку в клітинах.

При уведенні 8-ТСХ у мишей розвивається прихований діабет і відносно слабкий дефіцит цинку в клітинах панкреатичних острівців.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гольдберг Е.Д., Ещенко В.А., Бовт В.Д. Сахарный диабет. Этиологические факторы. - Томск: Изд-во Томск. ун-та, 1993. - 136 с.
2. Григорова Н. В. Вплив екстремальних факторів на вміст цинку в клітинах: Автореф. дис. канд. біол. наук: 03.00.13/ Тавр. нац. ун-т ім. Вернадського. – Сімферополь, 2002. – 20с.
3. Ещенко В.А. Гистохимическое исследование цинка // Цитология. - 1978. - №8. – С. 927-933.
4. Малько М.М. Метаболізм цинку в клітинах при фізичних навантаженнях, іммобілізації та алкоголізації // Вісник ЗДУ.: Фізико-математичні науки. Біологічні науки. - 1998. - №1. - С. 123-125.

5. Соколовский В.В. Гистохимические исследования в токсикологии. – Л.: Медицина, 1971. – 172с.
6. Хейхоу Ф. Г. Дж., Кваглино Д. Гематологическая цитохимия. - М.: Медицина, 1983. – 320 с.
7. Bettger W.T., O'Dell B.L. A critical physiological role of zinc in the structure and function of biomembranes // Life Sci. – 1981. – Vol.28. – P.1425-1438.
8. Bray T.M., Bettger W.J. The physiological role of zinc as an antioxidant // Free Radic. Biol. Med. – 1990. – Vol.8. – P.181-191.
9. Chausmer A. B. Zinc, insulin and diabetes / J. Am. Coll. Nutr. - 1998. – V.17. -P. 109 -115.
10. Vallee B.L. Zinc: biochemistry, physiology, toxicology and clinical pathology // Biofactors. – 1988. – Vol.1. – P.31-36.