УДК 669.5:61

КЛІТИННИЙ МЕТАБОЛІЗМ ЦИНКУ ПРИ УВЕДЕННІ ТВАРИНАМ СОЛЕЙ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ НА ФОНІ ІММОБІЛІЗАЦІЙНОГО СТРЕСУ

Григорова Н. В., асистент

Запорізький державний університет

При іммобілізаційному стресі спостерігається дефіцит цинку в клітинах [1]. Цей метал стабілізує клітинні мембрани, входить до складу багатьох металоензимів [2-5]. У деяких клітинах цинк акумулюється в слабо зв'язаному вигляді та легко доступний для цитохімічного виявлення [1, 6, 7]. Константи стабільності комплексів міді та ртуті вищі, ніж цинку, тому перші два метали можуть витискувати останній із його комплексів з біолігіндами [8]. У зв'язку з цим представляють інтерес дослідження впливу солей трьох указаних металів та обмін цинку в клітинах в іммобілізованих тварин. Для цитохімічного дослідження цинку парафінові зрізи тканин флуорохромували 8-(п-толуолсульфоніламіно)-хіноліном (8-ТСХ).

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Цитохімічні дослідження цинку проводили в клітинах панкреатичних острівців, базальних відділів кишкових крипт (клітинах Панета) та кінцевих відділів передміхурової залози в дослідах на 72 мишах. Із них 16 тварин були контрольними (інтактними), 17 – зазнавали впливу однієї тільки імобілізації, 12 – отримували також цинк, 14 – мідь, 13 – ртуть. Для іммобілізації мишей прив'язували на 6 год на станку спиною униз при допомозі м'яких пов'язок. Після закінчення цього терміну тваринам уводили в шлунок через зонд у вигляді водних розчинів 10 мг/кг оцтовокислого цинку, 5 мг/кг сірчанокислої міді або 5 мг/кг хлориду ртуті. Ці процедури повторювали щоденно протягом 1 місяця. Потім мишей забивали декапітацією. Шматочки органів фіксували протягом 12 год у холодному (4° С) ацетоні, потім проводили через два ксилоли (по 15 хв у кожнім), суміш 50% ксилолу та 50% парафіну (30 хв при 37° С), два рідкі парафіни (по 1,5 год у кожнім при 56° С) і заливали в парафін.

Парафінові зрізи готували товщиною 5 мкм. Депарафінували їх шляхом витримування у двох ксилолах (по 3 хв у кожнім). Потім зрізи проводили через два ацетони (по 3 хв у кожнім). На підготовлені таким чином зрізи наносили 0,01%-ний ацетоновий розчин 8-ТСХ . Через 1 хв зрізи промивали дистильованою водою та вивчали під люмінесцентним мікроскопом. Світлофільтр ЖС-18 використовували для збудження люмінесценції, а світлофільтр із скла ЖС-18 застосовували як захисний (запираючий, окулярний). На приготовлених таким чином препаратах у цитоплазмі панкреатичних клітин В, клітин Панета, кінцевих відділів передміхурової залози виявлялась зернистість, яка світиться жовто-зеленим світлом. Кількість цієї зернистості служить показником вмісту цинку в клітинах.

Для цитохімічного визначення інсуліну в панкреатичних клітинах В шматочки підшлункової залози фіксували в рідині Буена протягом 24 год. Потім шматочки збезводнювали в спиртах зростаючої концентрації (70°-ний, 80°-ний, 90°-ний, 96°-ний, абсолютний – по 4 год у кожнім) і проводили через ксилоли, кашу, рідкі парафіни, як описано вище.

Парафінові зрізи товщиною 5 мкм витримували у двох ксилолах (по 3 хв у кожнім), спиртах зростаючої міцності (абсолютний, 96°-ний, 90°-ний, 80°-ний, 70°-ний – по 3 хв у кожнім), промивали протягом 5 хв у дистильованій воді. Потім зрізи витримували в окислювачі до порудіння. Для приготування останнього змішували 1 частину 2,5%-ного розчину перманганату калію, 1 частину 5%-ного розчину сірчаної кислоти та 4 частини дистильованої води. Після окислювання зрізи витримували (до знебарвлювання) у 2,5%-ному розчині щавлевої кислоти або бісульфіту натрію. Потім зрізи промивали в дистильованій воді (5 хв) та забарвлювали альдегдфуксином. Для приготування останнього 250 мг альдегідфуксину розчиняють у 25 мл 70°-ного спирту, потім додається 75 мл 70°-ного спирту та 1 мл крижаної оцтової кислоти. Забарвлення зрізів проводять протягом 6 хв у закритому посуді.

Відразу після забарвлення зрізи диференціюються шляхом нанесення на них декількох краплин 96°-ного спирту і промиванням у водопровідній воді протягом 5 хв. Після цього зрізи замикаються в гліцерин-желатин, або оброблюються в спиртах зростаючої міцності, ксилолі та поміщаються в бальзам.

На препаратах у цитоплазмі панкреатичних клітин В виявляється синьо-фіолетова зернистість. Її кількість служить показником вмісту в клітинах гормону інсуліну.

Інтенсивність цитохімічної реакції 8-ТСХ і альдегідфуксину оцінювали за бальною системою. За один бал приймали слабопозитивну, два – помірну, три – виражену за інтенсивністю реакцію. На підставі підрахунку на 100 клітинах виводили середню величину інтенсивності цитохімічної реакції.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

У таблиці 1 наведені дані досліджень клітин В панкреатичних острівців.

Таблиця 1 – Інтенсивність цитохімічних реакцій 8-ТСХ і альдегідфуксину в панкреатичних клітинах В у мишей з іммобілізацією, отримавших ацетат цинку, сульфат міді та хлорид ртуті (контроль – інтактні тварини)

Група тварин	Кількість тварин	Інтенсивність реакції			
		8-ТСХ		альдегідфуксин	
		$\overline{X}$ ±m	p	$\overline{X}$ ±m	p
Контроль	16	2,0±0,13		1,3±0,11	
Іммобілізація	17	1,5±0,16	<0,05	0,9±0,07	<0,05
Іммобілізація + цинк	12	1,8±0,14	>0,05	1,2±0,11	>0,05
Іммобілізація+мідь	14	1,0±0,13	<0,001	0,7±0,07	<0,001
Іммобілізація + ртуть	13	0,9±0,09	<0,001	0,6±0,06	<0,001

У контрольних тварин інтенсивність реакції 8-ТСХ складала 2,0±0,13, а інтенсивність реакції альдегідфуксину – 1,3±0,11. Іммобілізація викликала зменшення в указаних клітинах вмісту цинку на 25%, а інсуліну – на 23%. Призначення оцтовокислого цинку викликало корекцію цих змін. При цьому вміст цинку був лише на 6%, а інсуліну – на 8% менше, ніж у нормі. Зворотній ефект спостерігали при уведенні міді та ртуті. У випадку призначення сульфату міді вміст цинку та інсуліну в клітинах панкреатичних острівців був відповідно на 45% і 46% менше порівняно з контрольними тваринами. При уведенні ртуті ці показники були вище, складали відповідно 50% і 54%.

Результати дослідження вмісту цинку в клітинах Панета і кінцевих відділів передміхурової залози представлені в таблиці 2.

Таблиця 2 – Інтенсивність цитохімічної реакції 8-ТСХ в клітинах базальних відділів кишкових крипт і кінцевих відділів передміхурової залози у мишей з іммобілізацією, отримавших ацетат цинку, сульфат міді та хлорид ртуті (контроль – інтактні тварини)

Група тварин	Кількість тварин	Інтенсивність реакції			
		кишечник		передміхурова залоза	
		$\overline{X}$ ±m	p	$\overline{X}$ ±m	p
Контроль	14	1,1±0,10		1,4±0,11	
Іммобілізація	15	0,8±0,07	<0,05	1,0±0,09	<0,01
Іммобілізація +цинк	11	1,0±0,10	>0,05	1,2±0,11	>0,05
Іммобілізація + мідь	12	0,6±0,05	<0,001	0,7±0,06	<0,001
Іммобілізація + ртуть	12	0,5±0,04	<0,001	0,6±0,04	<0,001

В інтактних тварин інтенсивність цитохімічної реакції 8-ТСХ складала в клітинах Панета – 1,1±0,10, а в клітинах епітелію кінцевих відділів передміхурової залози – 1,4±0,11 (табл. 2). При іммобілізації цинку в клітинах кишечнику було на 27%, а в клітинах передміхурової залози – на 29% менше. Призначення солі цинку знижувало ці показники (відповідно на 9% і 14%). Сульфат міді та хлорид ртуті викликали ще більше зниження вмісту цинку в клітинах, ніж в іммобілізованих тварин. При уведенні міді цинку було менше порівняно з нормою в кишечнику на 45%, а в передміхуровій залозі – 50%. При уведенні солі ртуті ці показники складали відповідно 54% і 57%. Отримані дані вказують на те, що сіль цинку ослаблює ефект іммобілізації на вміст цинку в клітинах, а солі міді та ртуті, навпаки, збільшують цей ефект. Поясненням тому може бути здібність двох останніх металів витискувати цинк із його комплексів з біолігіндами.

ВИСНОВКИ

1. Іммобілізація мишей викликає зниження вмісту цинку в клітинах панкреатичних острівців, базальних відділів кишкових крипт, епітелію кінцевих відділів передміхурової залози.
2. Уведення тваринам ацетату цинку зменшує зміни, викликані іммобілізацією.
3. Уведення сульфату міді та хлориду ртуті, навпаки, підсилює зниження вмісту цинку в клітинах, викликаєме іммобілізацією.

ЛІТЕРАТУРА

1. Малько М. М. Метаболізм цинку в клітинах при фізичних навантаженнях, іммобілізації та алкоголізації //Вісник ЗДУ. – 1998. - № 1. – С. 123-125.
2. Bray T., Bettger W. J. The physiological role of zinc as an antioxidant //Free Radic. Biol. Med. – 1990. – V. 8. – P. 281-291.
3. Vallee B. L., Auld D. S. Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins //Biochemistry. – 1990. – Vol. 19. – P. 5647-5659
4. Huang T. M., Hung H. C., Chang T. C. Solvent kinetic isotope effects of human placental alkaline phosphotase in reverse micelles //Biochem. J. - 1998. - V. 330. - P. 267-275
5. Rigobello M. P., Collegaro M. T., Barron 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. 15. – P. 370-376
6. Ещенко В. А. Гистохимическое исследование цинка //Цитология. – 1978. - № 8. – С. 927-933.
7. Прохватілова А. В. Вивчення фізіологічної ролі цинку в клітинах //Вісник ЗДУ. – 1998. - № 1. – С. 144 -146
8. Альберт Э. Избирательная токсичность. – М.: Мир, 1989.