

УДК 669.5:61

ВПЛИВ ФІЗИЧНОГО НАВАНТАЖЕННЯ НА ВМІСТ ЦИНКУ ТА СЕКРЕТОРНОГО МАТЕРІАЛУ В КЛІТИНАХ ПАНЕТА ТА В-ІНСУЛОЦИТАХ СТАРИХ МИШЕЙ

К.П. Миргородська, Н.В. Григорова

Вплив фізичного навантаження на вміст цинку та секреторного матеріалу в клітинах Панета та В-інсулоцитах старих мишей. – К.П. Миргородська, Н.В. Григорова. – Вміст цинку та секреторного матеріалу в панкреатичних клітинах В та базальних відділах кишкових крипт (клітинах Панета) був знижений у старих та стресованих фізичним навантаженням тварин. Кількість цього металу та секреторного матеріалу в даних клітинах старих тварин які піддавались такому навантаженню, була нижче, ніж у дорослих стресованих мишей. Зміни концентрації цинку у згаданих клітинах знаходились у відповідності зі зміною вмісту секреторного матеріалу. Дефіцит цинку в В-інсулоцитах супроводжувався зниженням вмісту цього металу в інших видах клітин у старих тварин.

Адреса: Запорізький національний університет, вул. Жуковського, 66, 69600, м. Запоріжжя, ГСП-41, Україна

Influence of physical load on zinc and secretory material content in pancreatic B-cell and Paneth cells of old mice. – C.P. Myrgorodska, N.V. Grygorova. – Zinc and secretory material in pancreatic B-cell and basal departments of intestine crypts (Paneth cells) were decreased in old mice and stressed with physical load mice. This metal and secretory material quantity in those cells of old animals subjected to such load was lower than that in adult stressed mice. Changes of zinc concentration in mentioned cells were in accordance with secretory material content alterations. Zinc deficit in B-insulocytes was accompanied by this metal content decrease in other cell types of old animals.

Address: Zaporozhye national university, 66, Zhukovskogo str., 69600, Zaporozhye, Ukraine

Вступ

Цинк відіграє важливу роль в організмі [1, 3, 4, 10, 16, 18]. Він є складовою частиною більшості металоензимів [11, 12, 14, 16-18], стабілізує клітинні мембрани [8-10, 15, 18]. Під впливом екстремальних факторів здійснюються зміни ферментативної активності та проникності мембран в клітинах [5]. Тому певний інтерес викликає питання, як при дії стресових факторів змінюється вміст внутрішньоклітинного цинку. Для цитохімічного визначення цього металу в клітинах нами була використана високочутлива селективна реакція 8-(п-толуолосульфоніламіно)-хіноліну (8-TSX). Для визначення секреторного матеріалу в клітинах Панета використовували забарвлення флоксином, у В-інсулоцитах - альдегідфуксином. При виконанні цієї роботи були проведені дослідження на мишах різного віку (дорослі та старі). Найбільша частина робіт, присвячених визначенню цинку в клітинах, відноситься до В-клітин панкреатичних острівців [4]. Відомо, що два йони цинку спроможні зв'язати шість молекул інсуліну [10, 13]. Гексамер, який утворюється при цьому, мабуть, акумулюється в секреторних гранулах вказаних клітин [2, 10]. Для вирішення цього питання нами були проведені порівняльні дослідження вмісту цинку та інсуліну в клітинах при різних експериментальних станах, які змінюють

секреторну активність В-клітин панкреатичних острівців. Такими станами, зокрема, були вікові відмінності та фізичне навантаження. Для порівняння нами проводилися дослідження цинку та секреторного матеріалу в інших клітинах (клітинах Панета) при дії цих факторів.

Матеріали і методи досліджень

У дослідах були використані 65 лабораторних мишей. До дорослих тварин ми відносили лабораторних мишей віком 6 місяців, старих – 12 і більше. Для створення умов одноразового фізичного навантаження (ОФН) тварин поміщали в акваріум з температурою води 32⁰С, де вони плавали протягом 1 години. У випадку хронічного дослідження таку процедуру повторювали щоденно протягом 10 днів.

Забивали мишей декапітацією через 2 години після останнього фізичного навантаження. Для дослідження брали підшлункову залозу та тонку кишку. Для визначення рівня цукру модифікованим методом Хаггедорна-Йенсена у тварин за життя брали проби крові.

Для цитохімічного визначення цинку в підшлунковій залозі та тонкому кишечнику шматочки цих органів фіксували в холодному (4⁰С) ацетоні протягом 12 год, потім витримували у двох ксилілах (по 15 хв у кожному), суміші 50% кси-

лолу та 50% парафіну (30 хв при 40°C), двох рідких парафінах (по 1,5 год у кожному при 56°C) та заливали у парафін. Зрізи 5 мкм завтовшки обробляли протягом 1 хв 0,01% ацетоновим розчином 8-ТСХ, промивали протягом 5 хв дистильованою водою, замикали у гліцерин та розглядали під люмінесцентним мікроскопом. Для збудження люмінесценції використовували світлофільтр ФС-1, в якості захисного (окулярного) застосовували світлофільтр зі скла ЖС-18. На препаратах цинк визначали по жовто-зеленій люмінесценції В-клітин панкреатичних островців та базальних відділів кишкових крипт.

Для цитохімічного виявлення інсуліну в панкреатичних клітинах В шматочки підшлункової залози фіксували протягом 24 год у суміші пікринової кислоти, формаліну, оцтової кислоти (рідині Буена). Потім шматочки зневоднювали у серії спиртів зростаючої міцності (70⁰-ний, 80⁰-ний, 90⁰-ний, 100⁰-ний – по 4 год у кожному), двох ксилолах, суміші ксилолу та парафіну, двох рідких парафінах та заливали у парафін, як вказано вище.

Депарафінували зрізи витриманням їх у двох ксилолах (по 3 хв у кожному), спиртах знижуючої концентрації (100⁰-ний, 96⁰-ний, 90⁰-ний, 80⁰-ний, 70⁰-ний – по 3 хв у кожному), водопровідній воді (5 хв). Надалі обробляли зрізи до порудіння окислювачем (сумішшю перманганату калію та сірчаної кислоти), знебарвлювали їх відновником (розчином шавлевої кислоти), промивали дистильованою водою (5 хв).

Парафінові зрізи 5 мкм забарвлювали протягом 5 хв 0,25% спиртовим розчином альдегід фуксину протягом 6 хв. Зрізи забарвлювали у закритій посудині, потім їх виймали з неї, обробляли 96⁰-ним спиртом, промивали впродовж 5 хв водопровідною водою та замикали у гліцерин-желатин. На препаратах інсулін виявляли по наявності в клітинах В островців синьо-фіолетової зернистості.

Для цитохімічного визначення секреторного шматочки тонкої кишки фіксували протягом 24

годин у нейтральному формаліні. Потім шматочки органу доводили до парафіну, як описано у випадку з альдегідфуксиною реакцією та заливали в нього.

Парафінові зрізи 5-10 мкм завтовшки фарбували протягом 3 хв 0,5% розчином флоксину. Забарвлені флоксином зрізи витримували по 1-2 хв у 96⁰ та абсолютному спиртах, потім обробляли в двох частинах ксилолу (по 1-2 хвилині в кожній) та замикали в бальзам. На препаратах в цитоплазмі панетовських клітин виявлялись гранули червоного кольору.

Інтенсивність цитохімічних реакцій флоксину, 8-ТСХ та альдегідфуксину оцінювали за трибальною системою, запропонованою В.В. Соколовським [6] та Ф. Хейхоу і Д.Квагліно [7]. За один бал приймали слабо позитивну, два бали – помірну, три бали – виражену за інтенсивністю реакцію. Підраховували середню арифметичну (\bar{X}), похибку (m), показник вірогідності (p).

Результати дослідження та їх обговорення

У таблиці 1 наведені дані визначення вмісту цинку та інсуліну в панкреатичних клітинах В у старих мишей після одноразового фізичного навантаження.

В контрольних (інтактних, дорослих) мишей вміст цукру (глікемія) дорівнювалося 5,8±0,19 ммоль/л, цинку визначалось в панкреатичних клітинах В 2,1±0,14 ум.од., інсуліну - 1,5±0,11 ум.од. При одноразовому фізичному навантаженні (ОФН) рівень цукру в крові дорослих мишей був підвищений на 43% (8,3±0,42 ммоль/л; p<0,001), вміст цинку в островцях був підвищений на 24% (p<0,05), а інсуліну – на 27% (p<0,05). При одноразовому фізичному навантаженні у старих мишей були отримані наступні дані: рівень цукру в крові був підвищений на 62% (8,3±0,42 ммоль/л; p<0,001), вміст цинку в островцях був підвищений на 9% (p>0,05), а вміст інсуліну був підвищений на 13% (p>0,05).

Таблиця 1. Інтенсивність цитохімічних реакцій 8-ТСХ та альдегідфуксину (АФ) в В-інсуоцитах старих мишей при одноразовому фізичному навантаженні (ОФН) ($\bar{X} \pm m$).

Table 1. Intensity of 8-TSQ and aldehyde fuchsine reactions in B-insyocytes of old mice under one-fold physical load (OPL).

Група тварин Animal group	Інтенсивність реакції, ум. од. Intensity of reactions	
	8-ТСХ 8-TSQ	АФ AF
Контроль (дорослі) (n=12) Control (adult)	2,1±0,14	1,5±0,11
ОФН (дорослі) (n=12) OPL (adult)	2,6±0,17*	1,9±0,16*
ОФН (старі) (n=12) OPL (adult)	2,3±0,15	1,7±0,12

Примітка: * - p<0,05

Про характер впливу фізичного навантаження в хронічному експерименті на вміст цинку та інсуліну в клітинах В панкреатичних острівців старих мишей свідчать дані таблиці 2.

При багаторазовому фізичному навантаженні рівень цукру в крові дорослих мишей був знижений на 14% ($5,0 \pm 0,21$ ммоль/л; $p < 0,01$), вміст цин-

ку в В-інсулоцитах був знижений на 24% ($p < 0,01$), а інсуліну – на 27% ($p < 0,01$). При багаторазовому фізичному навантаженні рівень цукру в крові старих мишей був знижений на 21% ($4,6 \pm 0,16$ ммоль/л; $p < 0,001$), вміст цинку в В-інсулоцитах був знижений на 38% ($p < 0,001$), а вміст інсуліну був знижений на 47% ($p < 0,001$).

Таблиця 2. Інтенсивність цитохімічних реакцій 8-ТСХ та альдегідфуксину (АФ) в В-інсуоцитах старих мишей при багаторазовому фізичному навантаженні (БФН) ($\bar{x} \pm m$).

Table 2. Intensity of 8-TSQ and aldehyde fuchsine reactions in B-insyocytes of old mice under several-fold physical load (SPL).

Група тварин Animal group	Інтенсивність реакції, ум. од. Intensity of reactions	
	8-ТСХ 8-TSQ	АФ AF
Контроль (дорослі) (n=12) Control (adult)	2,1±0,14	1,5±0,11
БФН (дорослі) (n=14) SPL (adult)	1,6±0,12**	1,1±0,07**
БФН (старі) (n=15) SPL (old)	1,3±0,10***	0,8±0,05***

Примітка: ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$

В таблиці 3 надані дані досліджень вмісту цинку та секреторного матеріалу в клітинах базальних відділів кишкових крипт старих мишей з одноразовим фізичним навантаженням.

У контрольних (інтактних, дорослих) мишей інтенсивність цитохімічної реакції 8-ТСХ в клітинах Панета (вміст цинку) складала $1,1 \pm 0,08$ ум. од., а флоксину (вміст секреторного матеріалу) -

$1,1 \pm 0,07$ ум. од. При одноразовому фізичному навантаженні (ОФН) вміст цинку в клітинах Панета дорослих мишей був підвищений на 36% ($p < 0,01$), а секреторного матеріалу на 36% ($p < 0,001$). При одноразовому фізичному навантаженні вміст цинку в клітинах Панета старих мишей був підвищений на 18% ($p > 0,05$), вміст секреторного матеріалу був підвищений на 9% ($p > 0,05$).

Таблиця 3. Інтенсивність цитохімічних реакцій 8-ТСХ та флоксину в клітинах Панета старих мишей при одноразовому та багаторазовому фізичному навантаженні (ОФН) ($\bar{x} \pm m$).

Table 3. Intensity of 8-TSQ and phloxine reactions in Paneth's of old mice under one-fold physical load (OPL).

Група тварин Animal group	Інтенсивність реакції, ум. од. Intensity of reactions	
	8-ТСХ 8-TSQ	Флоксин phloxine
Контроль (дорослі) (n=12) Control (adult)	1,1±0,08	1,1±0,07
ОФН (дорослі) (n=12) OFL (adult)	1,5±0,11**	1,5±0,10***
ОФН (старі) (n=12) OFL (pld)	1,3±0,09	1,2±0,08

Примітка: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$

В таблиці 4 надані дані досліджень вмісту цинку та секреторного матеріалу в клітинах базальних відділів кишкових крипт старих мишей з багаторазовим фізичним навантаженням.

При багаторазовому фізичному навантаженні у дорослих мишей отримані дані: вміст цинку знижений на 36% ($p < 0,001$), а секреторного матеріалу на 28% ($p < 0,001$). При багаторазовому фізичному навантаженні у старих мишей вміст цинку знижений на 55% ($p < 0,001$), вміст секреторного матеріалу був знижений на 55% ($p < 0,001$).

Отримані дані показують що з віком відбувається зменшення рівня цинку та інсуліну в клітинах. У старих тварин дефіцит цинку та інсуліну в клітинах пов'язаний з переважанням катаболічних процесів.

Одноразове фізичне навантаження (гострий стрес) викликало підвищення рівня цинку та інсуліну в панкреатичних клітинах В. У старих стресованих мишей таке підвищення менше, ніж у дорослих стресованих тварин.

Таблиця 4. Інтенсивність цитохімічних реакцій 8-ТСХ та флоксину в клітинах Панета старих мишей при одноразовому та багаторазовому фізичному навантаженні (БФН) ($\bar{X} \pm m$)

Table 4. Intensity of 8-TSQ and phloxine reactions in Paneth's of old mice under several-fold physical load (SPL)

Група тварин Animal group	Інтенсивність реакції, ум. од. Intensity of reactions	
	8-ТСХ 8-TSQ	Флоксин phloxine
Контроль (дорослі) (n=12) Control (adult)	1,1±0,08	1,1±0,07
БФН (дорослі) (n=14) SFL (adult)	0,7±0,05***	0,8±0,06***
БФН (старі) (n=15) SFL (old)	0,5±0,04***	0,5±0,03***

Примітка: *** - $p < 0,001$

У випадках багаторазового фізичного навантаження (хронічний стрес) у дорослих та старих тварин спостерігалось зниження вмісту цинку та інсуліну, причому дефіцит цих компонентів в клітинах більш виражений у старих тварин.

Вміст цинку та інсуліну в клітинах В може слугувати чутливим індикатором їхнього функціонального стану. Отримані дані, вказують на те, що вміст цинку в цих клітинах залежить від функціонального стану інсулярного апарату.

Подібні зміни спостерігались і в клітинах Панета. Одноразове фізичне навантаження викликало підвищення рівня цинку та секреторного матеріалу в клітинах Панета, причому у старих стресованих мишей таке підвищення менше, ніж у дорослих стресованих мишей. У випадках багатора-

зового фізичного навантаження у дорослих та старих тварин спостерігалось зниження вмісту цинку та секреторного матеріалу, причому дефіцит цих компонентів в клітинах більш виражений у старих тварин.

Висновки

Таким чином, дефіцит цинку в клітинах Панета супроводжувався зменшенням в них секреторного матеріалу, що вказує на можливий зв'язок цих двох компонентів у клітинах подібно до цинк-інсулінового комплексу в панкреатичних клітинах В (депо-форма інсуліну).

1. Авцын А.П., Жаворонков А.А., Риш М.А., Строчкова Л.С. Микроэлементозы человека. – М.: Медицина, 1991. – 496 с.
2. Балаболкин М.И. Диабетология. – М.: Медицина, 2000. – 671 с.
3. Берегова Т.В., Єщенко Ю.В. Зміни вмісту цинку в клітинах при різних функціональних станах інсулярного апарату підшлункової залози // Вісник ЗДУ. – 2003. - №1. – С. 11-15.
4. Ещенко В.А. Гистохимическое исследование цинка // Цитология. – 1978. – Т.20, №8. – С. 927-933.
5. Панин А.Е. Биохимические механизмы стресса. – Новосибирск: Наука, 1983. – 234 с.
6. Соколовский В.В. Гистохимические исследования в токсикологии. – Л.: Медицина, 1971. – 172 с.
7. Хейхоу Ф.Г.Дж., Кваглино Д. Гематологическая цитохимия. – М.: Медицина, 1983. – 320 с.
8. 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.
9. Bray T.M., Bettger W.J. The physiological role of zinc as an antioxidant // Free Radic. Biol. Med. – 1990. – Vol.8, №3. – P.281-291.
10. Chausmer A.B. Zinc, insulin and diabetes // J. Coll. Nutr.-1998. – Vol.17, №2. – P. 109-115.
11. Furner A.J. Exploring the structure and function of zinc metalloproteinase: old enzymes and new discoveries // Biochem. Soc. Trans. – 2003. – Vol. 31, Pt 3. – P. 723-727.
12. Parkin G. Synthetic analogs of zinc enzymes // Met. Jons Biol. Syst. – 2001. – Vol.38. – P. 411-460.
13. Rahuel-Clermont S., French C.A., Kaarsholm N.C., Dunn M.F., Chon C.I. Mechanisms of stabilization of the insulin hexamer through allosteric ligand interactions // Biochemistry. – 1997. – Vol. 36, №19. – P. 5837-5845.
14. Tan X., Bramlett M.R., Lindahe P.A. Effect of Zn on acetyl coenzyme A synthase: evidence for a conformational change in the alpha subunit during catalysis // J. Am. Chem. Soc.- 2004. – Vol.126,- №19. – P. 5954-5955.
15. Toyama A., Takahashi Y., Takenchi H. Catalytic structural role of metal free histidine residue in bovine Cu-Zn superoxide dismutase // Biochemistry.-2004. – Vol.43, №16. – P. 4670-4679.
16. Vallee B.L. Zinc: biochemistry, physiology, toxicology and clinical pathology // Biofactors. – 1988. – Vol.1, №1. – P. 31-36.
17. Vallee B.L., Auld D.S. Zinc coordination, function and structure of zinc enzymes and other proteins // Biochemistry. – 1990. – Vol.29, №24. – P. 5647-5659.

Отримано: 10 жовтня 2007 р.

Прийнято до друку: 27 листопада 2007 р.