

Т.В.Берегова, Н.В.Григорова, Ю.В.Єщенко, В.Д.Бовт, В.А.Єщенко

Визначення вмісту цинку та інсуліну в острівцевих клітинах при різному функціональному стані інсулярного апарату

Изучали роль цинка в инкреторной функции поджелудочной железы. Были исследованы панкреатические клетки В золотистых хомячков и людей при различном функциональном состоянии инсулярного аппарата. Наблюдалось повышение содержания цинка и инсулина в островковых клетках В при угнетении их секреторной активности и снижение – при ее усилении. При панкреатическом диабете эти показатели были значительно меньше нормы, а результаты сравнительных исследований подкрепляют положение о их связи.

ВСТУП

Цинк є життєво важливим елементом в організмі людини та тварин [1, 4, 13, 14, 17]. Він необхідний для активності понад 200 ферментів [1, 16–18], підтримує інтегральну структуру та функцію біомембран [12, 19].

Значення цинку в інсулінпродукуючих клітинах достатньо висвітлено [2, 3, 6–10]. Відомо, що два його атоми спроможні зв'язувати шість молекул інсуліну [13]. Вважають, що гексамер, який при цьому утворюється, накопичується в секреторних гранулах інсулінпродукуючих клітин [2].

Для вирішення цього питання нами були вивчені топомімічні відношення в панкреатичних клітинах В цинку та інсуліну й був проведений кореляційний аналіз змін вмісту двох компонентів в клітинах при різному функціональному стані інсулярного апарату. У зв'язку з цим були розроблені методи цитохімічного виявлення цинку та інсуліну, які давали стабільні порівняльні результати.

Основна частина опублікованих робіт була виконана за допомогою якісних цитохімічних реакцій [5–8, 14, 15]. Там, де

були застосовані напівкількісні методи [3], не проводився кореляційний аналіз отриманих даних.

У дослідах на мишах [3] було показано, що вміст цинку та інсуліну в панкреатичних клітинах В був підвищений при голодуванні, введенні адреналіну та преднізолону і знижений після ін'єкцій глюкози, пілокарпіну, алоксану. Нами були досліджені золотисті хом'ячки, оскільки за морфологічними характеристиками їх острівцева тканина наближається до людської [5]. Результати експериментальних досліджень на тваринах ми підкріпляли даними досліджень шматочків підшлункової залози здорових осіб, які загинули від несподіваних травм, або людей, які померли від цукрового діабету.

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на 87 золотистих хом'ячках з різним функціональним станом інсулярного апарату підшлункової залози. Контролем були інтактні тварини. Обстежено також 38 здорових і хворих на діабет осіб. Пригнічення секреторної функції інсулінпродукуючих клітин викликали голоду-

ванням тварин упродовж 1 доби, підшкірною ін'єкцією 0,05 мг/кг адреналіну, внутрішньом'язовим введенням 5–10 мг/кг преднізолону, а підсилення цієї функції – внутрішньоочеревинним введенням 10 г/кг глюкози та підшкірною ін'єкцією 1 мг/кг пілокарпіну. Для виключення функції інсулярного апарату хом'ячкам вводили підшкірно 400 мг/кг діабетогенного агента алоксану, який вибірково ушкоджує панкреатичні клітини В.

Тварин декапітували по закінченні терміну голодування, через 2 год після введення глюкози, адреналіну, преднізолону, пілокарпіну та через 5 діб після ін'єкції алоксану.

Шматочки підшлункової залози фіксували протягом 12 год у холодному ацетоні (для цитохімічного визначення цинку в панкреатичних острівцях) і впродовж 24 год при кімнатній температурі – у рідині Буена (для цитохімічного виявлення інсуліну).

Фіксовані в ацетоні шматочки проводили через ксилоли, суміші ксилолу та парафіну, рідкі парафіни та заливали в парафін [8]. Шматочки залози, фіксовані у рідині Буена, заливали парафіном [7].

Парафінові зрізи готували завтовшки 5–10 мкм та безпосередньо переносили на предметні скельця, покриті яєчним білком, або у пробірку з широким горлом. Зрізи, приготовлені зі шматочків, фіксованих у ацетоні, депарафінували витриманням у ксилолах, ацетонах, дистильованій воді, обробляли їх 0,01%-м ацетоновим розчином 8-(п-толуолсульфоніламіно)-хіноліну (8 – ТСХ) і розглядали під люмінесцентним мікроскопом [8]. На препаратах у цитоплазмі клітин В панкреатичних острівців виявляли гранули, що люмінесціювали жовто-зеленим світлом. Кількість цих гранул – показник вмісту цинку в клітинах (рисунок).

Зрізи, приготовлені зі шматочків залози, фіксованих у рідині Буена, послідовно депарафінували, витримували в окиснику, відновнику та забарвлювали альдегідфуксином [5]. На препаратах у цитоплазмі острівцевих клітин В виявляли синьо-фіолето-

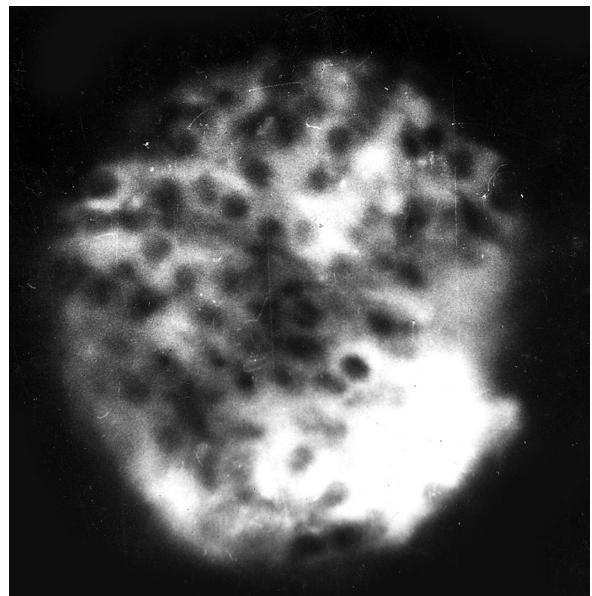
ву зернистість, кількість якої – показник вмісту в клітинах інсуліну.

Обробка зрізів у наших модифікаціях дала змогу отримувати результати, які можна було порівнювати та проводити кореляційний аналіз.

Інтенсивність цитохімічних реакцій оцінювали за бальною системою [10, 11]. За один бал приймали слабопозитивну, два бали – помірну, три бали – виражену за інтенсивністю реакцію. При підрахунку на 100 клітинах виводили середнє арифметичне значення (\bar{X}), похибку (m), показник вірогідності (P), коефіцієнт кореляції (r) [9].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На препаратах, забарвлених 8-ТСХ та альдегідфуксином, гранули концентрувалися в апікальних (секреторних) полюсах В-інсулоцитів, особливо навколо синусоїдів острівців. Відповідність розподілу двох типів зернистості у В-клітинах свідчить про ідентичність гранул цинку та інсуліну. На



Цитохімічна реакція 8-(п-толуолсульфоніламіно)-хіноліну в панкреатичному острівці золотистого хом'ячка. У цитоплазмі В-клітин визначаються люмінесцюючі гранули цинку

користь цієї думки вказують дані електронно-мікроскопічного дослідження, що показали наявність в клітинах В острівців тільки одного типу гранул [5].

У хом'ячків, які голодували, отримали адреналін та преднізолон, вміст гранул цинку та інсуліну в панкреатичних клітинах В був підвищеним, що пояснюється зниженням секреторної активності цих клітин. Зворотна картина спостерігалася у тварин, які отримували глюкозу та пілокарпін: вміст двох типів зернистості був зниженим. Це явище можна пояснювати підсиленням секреторної активності клітин В під впливом пілокарпіну та глюкози, специфічного стимулятора секреції інсуліну.

Більш виражені зміни в острівцях спостерігалися після введення тваринам алоксану. Число клітин В в острівцях було істотно зниженим. Клітини містили різко зменшений вміст гранул цинку та інсуліну. У деяких випадках спостерігалися повна та майже повна дегрануляція більшості острівцевих клітин.

У табл. 1 наведено результати напівкількісного підрахунку вмісту цинку та інсуліну в панкреатичних клітинах В золотистих хом'ячків при різному функціональному стані цих клітин. У контрольних (інтактних) хом'ячків у клітинах В панкреатичних острівців вміст цинку та інсуліну становив $1,6 \pm 0,09$ і $1,4 \text{ ум.од.} \pm 0,07 \text{ ум.од.}$ відповідно. Коефіцієнт кореляції змін вмісту цих компонентів дорівнював $0,54$ ($P < 0,01$). При голодуванні спостерігалася підвищення вмісту цинку на 31% ($P < 0,001$), інсуліну – на 21% ($P < 0,01$). Коефіцієнт кореляції дорівнював $0,79$ ($P < 0,01$). Введення

глюкози викликало, навпаки, зниження вмісту цинку на 19% ($P < 0,01$) та інсуліну – 14% ($P < 0,05$). При цьому $r = 0,56$ ($P < 0,01$). Більш виражений дефіцит двох компонентів спостерігався при діабеті: вміст цинку в клітинах В був зниженим на 81% ($P < 0,001$), інсуліну – на 93% ($P < 0,001$), $r = 0,86$ ($P < 0,001$).

Отримані в експерименті результати вказують на залежність вмісту двох компонентів у клітинах В від секреторної активності інсулярного апарату: накопичення їх у клітинах при пригніченні секреторної активності клітин та зменшення їх депо при підсиленні цієї активності. Виснаження секреторної функції клітин В при діабеті викликає виснаження в них депо цинку та інсуліну.

У табл. 2 наведено результати напівкількісного підрахунку вмісту цинку та інсуліну у людей. У здорових осіб у панкреатичних клітинах В вміст цинку становив $1,9 \text{ ум.од.} \pm 0,14 \text{ ум.од.}$, а інсуліну – $1,2 \text{ ум.од.} \pm 0,13 \text{ ум.од.}$; $r = 0,58$ ($P < 0,01$). В осіб, хворих на діабет, значення цих показників становило 79% ($P < 0,001$) і 67% ($P < 0,001$) відповідно, $r = 0,89$ ($P < 0,001$).

Наведені результати вказують на те, що у людей, як і у тварин, вміст цинку та інсуліну в клітинах В острівців знижується при діабеті, причому спостерігається відповідність змін двох компонентів у клітинах.

Відомо, що катехоламіни та глюкокортикоїди впливають на функціональний стан інсулярного апарату підшлункової залози [5]. Вони активують α -адренорецептори панкреатичних клітин В, що викликає зниження секреції інсуліну. Зворотні результати

Таблиця 1. Вміст (ум.од.) цинку та інсуліну в панкреатичних клітинах В золотистих хом'ячків ($\bar{X} \pm m$)

Група тварин	Цинк	Інсулін
Інтактні тварини	$1,6 \pm 0,09$	$1,4 \pm 0,07$
Тварини, які голодували	$2,1 \pm 0,11^{***}$	$1,7 \pm 0,08^{**}$
Тварини, які отримали		
глюкозу	$1,3 \pm 0,06^{**}$	$1,2 \pm 0,05^*$
алоксан	$0,3 \pm 0,02^{***}$	$0,1 \pm 0,01^{***}$

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

спостерігаються при введенні пілокарпіну, який є антагоністом катехоламінів.

Нами було показано, що у хом'ячків інтенсивність цитохімічної реакції 8-ТСХ у В-клітинах була підвищена на 25 % (2,0 ум.од. \pm 0,12 ум.од.; $P < 0,001$), а реакції альдегід-фуксину – на 29 % (1,8 ум.од. \pm 0,10 ум. од.; $P < 0,001$) після ін'єкції адреналіну ($r = 0,78$; $P < 0,001$). Аналогічні результати отримано у разі введення преднізолону (2,0 ум.од. \pm 0,13 ум. од.; $P < 0,01$), (1,7 ум.од. \pm 0,11 ум. од.; $P < 0,05$), ($r = 0,65$; $P < 0,01$). Після ін'єкції хом'ячкам пілокарпіну вміст цинку в В-клітинах острівців знижувався на 31 % (1,1 ум.од. \pm 0,09 ум. од.; $P < 0,001$), а інсуліну – на 36 % (0,9 ум.од. \pm 0,06 ум. од.; $P < 0,001$), ($r = 0,74$; $P < 0,001$).

Наші результати підтверджують положення про підвищену концентрацію цинку й інсуліну в В-клітинах під впливом гормонів надниркових залоз. Відомо, що накопичення цинку в клітинах здійснюється за участю білка металотіонеїну [1].

На основі отриманих результатів та літературних даних можна так уявити механізм гранулоутворення в панкреатичних клітинах В. Під впливом надниркових гормонів (катехоламінів, глюкокортикоїдів) активуються α -адренорецептори, які гальмують секрецію інсуліну. Ці гормони одночасно підсилюють біосинтез металотіонеїну, який зв'язує та переносить цинк із екстрацелюлярних просторів всередину секреторних гранул, де він утворює комплекс (гексамер) з інсуліном.

ВИСНОВКИ

1. Пригнічення секреторної функції панкреатичних клітин В у золотистих хом'ячків,

які голодували та отримали адреналін, преднізолон, супроводжувалося підвищенням вмісту в них цинку та інсуліну.

2. Підсилення секреторної активності клітин В у хом'ячків, які отримали глюкозу та пілокарпін, викликало, навпаки, зниження вмісту в них двох компонентів.

3. Виключення інкреторної функції підшлункової залози у тварин, які отримали діабетогенний агент алоксан, призводило до розвитку дефіциту цинку та інсуліну в острівцевих В-клітинах.

4. Послаблення інкреторної функції підшлункової залози у людей, хворих на цукровий діабет, супроводжувалося зниженням вмісту цинку та інсуліну в панкреатичних клітинах В.

5. Результати кореляційного аналізу вказують на зв'язок двох компонентів в цих клітинах.

T.V.Beregova, N.V.Grigorova, J.V.Eshchenko, V.D.Bovt, V.A.Eshchenko

ZINC AND INSULIN CONTENT DETECTION IN ISLET CELLS UNDER VARIOUS FUNCTIONAL STATE OF INSULAR APPARATUS

The work is devoted to the study of zinc role in pancreas incretory function. Golden hamster and human pancreatic beta cells were investigated under various functional state of insular apparatus. An increase of zinc and insulin content in islet beta cells was observed during inhibition of its' secretory activity and decrease of both components content in the cells occurred after intensifying of its' activity. Under pancreatic diabetes zinc and insulin quantities in beta cells were significantly less the norm. The results of comparative investigations confirm the thesis concerning this metal and hormone connection in beta-insulocytes.

Kyiv National Shevchenko University

Zaporozhzhye National University

Таблиця 2. Вміст (ум.од.) цинку та інсуліну в панкреатичних клітинах В здорових і хворих на діабет осіб ($\bar{X} \pm m$)

Схема досліджу	Цинк	Інсулін
Контроль	1,9 \pm 0,14	1,2 \pm 0,13
Діабет	0,4 \pm 0,07***	0,4 \pm 0,03***

*** $P < 0,001$.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Авцын А.П., Жаворонков А.А., Риш М.А., Строчкова Л.С. Микроэлементозы человека (этиология, классификация, органопатология). – М.: Медицина, 1991. – 496 с.
2. Балаболкин М.И. Диабетология. – М.: Медицина, 2000. – 671с.
3. Берегова Т.В., Ещенко Ю.В. Зміни вмісту цинку в клітинах при різних функціональних станах інсулярного апарата підшлункової залози // Вісник ЗДУ. – 2003. – №1. – С.11–15.
4. Буров Ю.В., Ведерникова Н.Н. Нейрохимия и фармакология алкоголизма. – М.: Медицина, 1985. – 240 с.
5. Гольдберг Е.Д., Ещенко В.А., Бовт В.Д. Сахарный диабет. Этиологические факторы. – Томск: Изд-во Томск. ун-та, 1993. – 136 с.
6. Ещенко В.А. Блокирование цинка как возможная причина клеточной альтерации // Арх. патологии. – 1977. – **39**, №9. – С.55–61.
7. Ещенко В.А. Состояние островков Лангерганса у животных разных видов при введении 8 – (аренсульфониламино) – хинолинов // Пробл. эндокринологии. – 1978. – **24**, №3. – С.103-107.
8. Ещенко В.А. Гистохимическое исследование цинка // Цитология. – 1978. – **20**, №8. – С.927–933.
9. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. школа, 1980. – 293 с.
10. Соколовский В.В. Гистохимические исследования в токсикологии. – Л.: Медицина, 1971. – 172 с.
11. Хейхоу Ф., Кваглино Д. Гематологическая цитохимия. – М.: Медицина, 1983. – 320 с.
12. Bettger W.J., O'Dell L.L. A critical physiological role of zinc in the structure and function of biomembranes // Life Sci. – 1981. – **28**. – P.1405–1438.
13. Chausmer A.B. Zinc, insulin and diabetes // J. Amer. Coll. Nutr. – 1998. – **17**, №2. – P.109–115.
14. Goldberg E.D., Eshchenko V.A., Bovt V.D. Diabetogenic activity of chelators in some mammalian species // Endocrinology. – 1990. – **28**. – P.51–55.
15. Goldberg E.D., Eshchenko V.A., Bovt V.D. The diabetogenic and acidotropic effects of chelators // Exp. Pathol. – 1991. – **42**. – P.59–64.
16. Tudor R., Zaleski P.D., Ratnaike R.N. Zinc in health and chronic disease // J. Nutr. Health Aging. – 2005. – **9**, №1. – P.45–51.
17. Vallee B.L. Zinc: biochemistry, physiology, toxicology and clinical pathology // Biofactors. – 1988. – **1**, №1. – P.31–36.
18. Vallee B.L., Falchuk K.H. The biochemical basis of zinc physiology // Physiol. Rev. – 1993. – **73**, №1. – P.79–118.
19. Varvarra G., Traini T., Esposito P., Caputi S., Perinetti G. Copper - zinc superoxide dismutase activity in healthy and inflamed human dental pulp // Int. Endod. J. – 2005. – **38**, №3. – P.195–199.

*Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка;
Запорізьк. нац. ун-т*

*Матеріал надійшов до
редакції 02.01.2007*