

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

Зміни вмісту цинку в крові та клітинах різних органів при стресових впливах

В опытах на кроликах и мышях было показано, что острые стрессовые воздействия вызывают повышение содержания сахара в крови и цинка в гранулоцитах крови, гиппокампе, β -инсулоцитах, клетках базальных отделов кишечных крипт и концевых отделов предстательной железы. Такие же изменения возникали при введении адреналина и преднизолона. Инъекции пилокарпина, наоборот, вызывали снижение концентрации глюкозы в крови и цинка в клетках. Полученные результаты указывают на роль симпато-адреналовой системы в регуляции обмена цинка в клетках. Повышение содержания цинка в клетках при остром стрессе сопровождается снижением его концентрации в плазме крови. Это явление, по-видимому, связано с перемещением цинка из плазмы в клетки. Изменения содержания цинка в клетках у животных соответствовали изменениям в них количества секреторного материала, что указывает на возможные функциональные связи этих двух компонентов.

ВСТУП

Цинк необхідний для життєдіяльності живих організмів [1, 4, 15, 18]. Функція багатьох ферментів неможлива без його участі [14, 17, 19, 20]. Він підтримує інтегральну структуру та функцію клітинних мембран [11–13, 16, 21]. При дії екстремальних факторів порушується стабільність останніх і активність ферментів [3, 8]. У зв'язку з цим викликають значний інтерес дослідження вмісту цинку в клітинах при стресі. Для проведення таких досліджень були розроблені досконалі методи цитохімічного його визначення та застосовані методи спричинення стресу у тварин, які описані у монографії Паніна [8]. Показано, що за допомогою люмінесцентного реагента 8-(п-толуолсульфоніламіно)-хіноліну (8-ТСХ) можна отримувати високочутливу селективну реакцію на цинк у клітинах [6]. Дані про вміст цинку у різних органах, отримані за допомогою 8-ТСХ-реакції, та щодо визначень вмісту цинку в клітинах при стресі наведено в деяких працях [2, 5, 6].

Для з'ясування клітинно-молекулярних механізмів стресу важливо прослідкувати, як змінюється його вміст одночасно в клітинах і позаклітинному просторі.

Мета нашої роботи – вивчити характер розподілу цинку між плазмою крові та клітинами при стресі.

МЕТОДИКА

Експерименти проведено на 52 кролях і 86 мишах. Тварин іммобілізували прив'язуванням їх м'якими пов'язками до станка в положенні на спині на 6–8 год. У дослідах з охолодженням тварин поміщали на 1–2 год у холодну ванну з температурою води 21°C. В окремих дослідах тваринам вводили підшкірно 0,05 мг/кг адреналіну і 1 мг/кг пілокарпіну, а також внутрішньом'язово 5–10 мг/кг преднізолону.

У кролів кров брали з вуха, а у мишей – з хвоста для визначення вмісту цукру за методом Хагедорна–Йенсена, а також цинку в сироватці крові й гранулоцитах. Для визначення вмісту цинку в сироватці крові

нами був використаний колориметричний метод [8]. З метою цитохімічного його виявлення в гранулоцитах крові мазки одночасно фіксували та флуорохромували обробкою їх протягом 1–5 хв 0,01%-м спиртовим розчином 8-ТСХ. Після промивання протягом 5 хв у дистильованій воді мазки підсушували на повітрі. На них наносили краплі нефлуоресціюючої імерсійної олії. Препарати розглядали під люмінесцентним мікроскопом. Для збудження люмінесценції використовували світлофільтр ФС-1, а як захисний застосовували світлофільтр зі скла ЖС-18. На препаратах у гранулоцитах крові виявляли зернистість, яка люмінесціювала жовто-зеленим світлом.

Для цитохімічного визначення секреторного матеріалу в гранулоцитах крові мазки фіксували протягом 5 хв у парах формаліну, потім забарвлювали послідовно 1%-ми розчинами метилового фіолетового та флоксину, промивали дистильованою водою, висушували на повітрі та розглядали під мікроскопом. На препаратах у цитоплазмі базофілів визначалися сині, еозинофілів – червоні, нейтрофілів – фіолетові гранули. Кількість гранул оцінювали як вміст у клітинах секреторного матеріалу.

Тварин декапітували через 0,5–2 год після ін'єкції речовин, а також безпосередньо після закінчення строку іммобілізації та охолодження. Для дослідження брали головний мозок, підшлункову залозу, тонку кишку, передміхурову залозу. Головний мозок використовували для приготування заморожених зрізів товщиною 30–60 мкм. Шматочки інших органів фіксували в холодному (+ 4 °C) ацетоні протягом 12 год для визначення вмісту цинку в клітинах. Для визначення вмісту інсуліну в β -клітинах панкреатичних ostrivciv шматочки підшлункової залози фіксували впродовж 24 год у рідині Буена (суміші пікринової кислоти, формаліну, оцтової кислоти). Шматочки тонкої кишки та передміхурової залози фіксували протягом цього самого терміну в нейтральному формаліні. Парафінові зрізи

готували товщиною 5–10 мкм.

Зрізи головного мозку одночасно фіксували та флуорохромували обробкою їх упродовж 1–5 хв 0,01%-м ацетоновим розчином 8 – ТСХ. Потім зрізи промивали протягом 5 хв дистильованою водою, покривали шаром гліцерину і розглядали під люмінесцентним мікроскопом (світлофільтри ФС-1, ЖС-18). На препаратах цинк виявляли за жовто-зеленою люмінесценцією зубчастої фасції, полів СА2–СА4 гіпокампа.

Для визначення вмісту цинку в клітинах підшлункової залози, тонкої кишки, передміхурової залози парафінові зрізи цих органів витримували в двох ксилолах, спиртах, флуорохромували впродовж 1 хв 0,01%-м ацетоновим розчином 8 – ТСХ, промивали дистильованою водою, покривали шаром гліцерину та розглядали під люмінесцентним мікроскопом (світлофільтри ФС-1 та ЖС-18). На препаратах виявлялася жовто-зелена люмінесценція в клітинах панкреатичних ostrivciv, базальних відділів кишкових крипт (клітинах Панета), кінцевих відділів передміхурової залози.

Для цитохімічного визначення вмісту інсуліну в панкреатичних β -клітинах, депарафіновані зрізи підшлункової залози забарвлювали протягом 6 хв 0,25%-м розчином альдегідфуксину на 70⁰-му спирті, промивали водопровідною водою та покривали шаром гліцерин-желатину. На препаратах у цитоплазмі β -клітин визначали синьо-фіолетову зернистість – показник вмісту в них гормону інсуліну. Депарафіновані зрізи тонкої кишки та передміхурової залози забарвлювали флоксином. У цитоплазмі клітин Панета та кінцевих відділів цієї залози визначали червону зернистість – показник вмісту в клітинах секреторного матеріалу.

Інтенсивність цитохімічних реакцій оцінювали в умовних одиницях за бальною системою, що була запропонована Соколовським [9], а також Хейхоу та Квагліно [10]. За один бал приймали слабопозитивну,

Таблиця 1. Вміст цинку в сироватці крові та інтенсивність цитохімічної реакції 8-ТСХ у гранулоцитах крові та гіпокампі кролів при гострому стресі ($\bar{X} \pm m$)

Група тварин	Вміст цинку в сироватці крові, мкмоль/л	Інтенсивність реакції, ум.од.	
		Гранулоцити крові	Гіпокамп
Інтактні (n = 14)	26 ± 3,4	1,2 ± 0,08	1,8 ± 0,11
Тварини, яких піддавали іммобілізації (n = 11)	15 ± 1,9**	1,7 ± 0,10***	2,4 ± 0,15***
охолодженню (n = 12)	16 ± 3,0*	1,5 ± 0,09*	2,2 ± 0,13*

Примітка. Тут і в табл. 2–4; * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001 у порівнянні з контролем.

два бали – помірну, три бали – виражену за інтенсивністю реакцію. Нормальний розподіл результатів дав змогу проводити їх математичну обробку за методом Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У табл. 1 наведено результати досліджень вмісту цинку в сироватці та гранулоцитах крові, а також – у гіпокампі кролів при стресових впливах. У сироватці крові кролів цей показник був знижений на 42 % (P < 0,01) при іммобілізації і на 38 % (P < 0,05) – при охолодженні, в гранулоцитах крові він був підвищений на 42 % (P < 0,001) та на 25 % (P < 0,05), а в гіпокампі – на 33 % (P < 0,001) та на 22 % (P < 0,05) відповідно.

Слід відмітити що, у кролів при стресових впливах вміст цинку був знижений у сироватці крові та підвищений у гранулоцитах і гіпокампі. Механізм цього можна пояснювати виходом цинку з плазми крові в клітини [1].

У табл. 2 наведено динаміку вмісту цукру в крові, цинку та інсуліну в панкреатичних β-клітинах у кролів при стресових

впливах. Як видно, вміст глюкози в крові був підвищений на 24 % (P < 0,01) при іммобілізації та на 26 % (P < 0,01) – при охолодженні. Вміст цинку в панкреатичних β-клітинах був підвищений на 32 % (P < 0,01) та на 21 % (P < 0,05), інсуліну – на 38 % (P < 0,01) та на 31 % (P < 0,05) відповідно.

Аналогічні результати було отримано в дослідях на мишах (табл.3,4). При гострому іммобілізаційному стресі був підвищений вміст цукру в крові на 37 % (P < 0,001), цинку в β-клітинах на 40 % (P < 0,001), інсуліну – на 33 % (P < 0,001). Після охолодження були підвищені: вміст глюкози в крові – на 30 % (P < 0,001), інтенсивність у цих клітинах реакції 8 – ТСХ – на 25 % (P < 0,05), реакції адельгідфуксину – на 40 % (P < 0,001; див. табл. 3).

При іммобілізації та охолодженні збільшувався вміст цинку в гіпокампі на 26 % (P < 0,01) і 32 % (P < 0,01), у клітинах Панета – на 55 % (P < 0,01) і на 55 % (P < 0,01), простати – 36 % (P < 0,001) і 43 % (P < 0,001) відповідно (див. табл. 4).

Описані зміни можна пояснити підсиленою інкреторною функцією надниркових

Таблиця 2. Вміст цукру в крові, інтенсивність цитохімічних реакцій 8-ТСХ та альдегідфуксину в панкреатичних острівцях кролів при гострому стресі ($\bar{X} \pm m$)

Група тварин	Вміст цукру в крові, ммоль/л	Інтенсивність реакції, ум.од.	
		8-ТСХ	альдегідфуксину
Інтактні (n = 14)	5,8 ± 0,32	1,9 ± 0,12	1,3 ± 0,11
Тварини, яких піддавали іммобілізації (n = 11)	7,2 ± 0,46**	2,5 ± 0,19**	1,8 ± 0,14**
охолодженню (n = 12)	7,3 ± 0,41**	2,3 ± 0,16*	1,7 ± 0,12*

Таблиця 3. Вміст цукру в крові, інтенсивність цитохімічних реакцій 8-ТСХ та альдегідфуксину в панкреатичних острівцях мишей при гострому стресі та введенні адреналіну, преднізолону, пілокарпіну ($\bar{X} \pm m$)

Група тварин	Вміст цукру в крові, ммоль/л	Інтенсивність реакції, ум.од.	
		8-ТСХ	альдегідфуксину
Інтактні (n = 14)	6,0 ± 0,23	2,0 ± 0,16	1,5 ± 0,07
Тварини, яких піддавали іммобілізації (n = 13)	8,2 ± 0,29***	2,8 ± 0,18***	2,0 ± 0,16***
охолодженню (n = 14)	7,8 ± 0,16***	2,5 ± 0,14*	2,1 ± 0,14***
Тварини, які отримали адреналін (n = 12)	11,6 ± 0,64***	2,6 ± 0,15**	1,9 ± 0,13**
преднізолон (n = 12)	11,4 ± 0,43***	2,7 ± 0,17**	1,9 ± 0,14**
пілокарпін (n = 13)	3,7 ± 0,54***	1,3 ± 0,14***	1,0 ± 0,06***

залоз. Це може підтверджувати підвищення вмісту цинку та інсуліну в β -клітинах, цинку – в гіпокампі, клітинах Панета, простаті після введення адреналіну та преднізолону, а також зменшення кількості цих компонентів у клітинах після ін'єкції пілокарпіну (див. табл.3,4).

Зміни вмісту цинку в гранулоцитах крові супроводжувалися відповідними змінами кількості в них секреторного матеріалу. Така сама закономірність простежувалася при дослідженні цинку та секреторного матеріалу в клітинах Панета. Так, інтенсивність цитохімічної реакції флоксину в клітинах Панета у контрольних мишей становила 0,9 ум.од. ± 0,08 ум.од., а при іммобілізації – 1,3 ум.од. ± 0,12 ум.од. ($P < 0,01$), після охолодження 1,2 ум.од. ± 0,09 ум.од. ($P < 0,05$). Відповідність змін вмісту цинку та секреторного матеріалу спостерігалася також при

дослідженні клітин кінцевих відділів передміхурової залози.

Таким чином, були виявлені однотипні зміни вмісту цинку та секреторного матеріалу в неоднакових клітинах у тварин різних видів при різних стресових впливах, що дає змогу віднести ці зміни до ознак неспецифічного адаптаційного синдрому, описаного в монографії Брауна та Моженок [3]. При стресових впливах цинк у значній кількості надходить у клітини, що супроводжується зменшенням його концентрації у плазмі крові. Оскільки вміст цинку, який визначається цитохімічно може бути показником їх функціонального стану [2, 5–7], отримані результати свідчать на користь участі гіпокампа, інсулярного апарату підшлункової залози та надниркових залоз у нейрогуморальній регуляції обміну цинку в клітинах [3, 11, 12, 16, 21]. Вхідження цин-

Таблиця 4. Інтенсивність цитохімічних реакцій 8-ТСХ у гіпокампі, клітинах Панета та передміхуровій залозі мишей при гострому стресі та введенні адреналіну, преднізолону, пілокарпіну ($\bar{X} \pm m$)

Група тварин	Інтенсивність реакції, ум.од.		
	Гіпокамп	Гранулоцити крові	Гіпокамп
Інтактні (n = 14)	1,9 ± 0,15	1,1 ± 0,15	1,4 ± 0,12
Тварини, яких піддавали іммобілізації (n = 13)	2,4 ± 0,12**	1,7 ± 0,12**	1,9 ± 0,05***
охолодженню (n = 14)	2,5 ± 0,16**	1,7 ± 0,11**	2,0 ± 0,14***
Тварини, які отримали адреналін (n = 12)	2,4 ± 0,14*	1,5 ± 0,10*	1,9 ± 0,12**
преднізолон (n = 12)	2,3 ± 0,10*	1,5 ± 0,09*	1,9 ± 0,14**
пілокарпін (n = 13)	1,0 ± 0,06***	0,7 ± 0,06*	0,8 ± 0,06***

ку в клітині при гострому стресі може розглядатись як захисна реакція, спрямована проти пошкоджувальної дії на них екстремальних факторів, враховуючи виражені антиоксидантні властивості цинку [3, 11, 12, 16, 21]. Вхідження цього металу в клітині здійснюється під впливом гормонів кори надниркових залоз, які підвищено секретуються в кров при гострому стресі [1].

Відповідність змін цинку та секреторного матеріалу в клітинах при різних експериментальних впливах вказує на можливий функціональний зв'язок цих компонентів.

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

ZINC CONTENT IN BLOOD AND CELLS OF VARIOUS ORGANS UNDER STRESS

It was shown in experiments on rabbit and mice that acute stress induced increase in glycemia and zinc content of blood granulocytes, hippocampus, beta-insulocytes, the cells of intestinal krypts basal departments and prostate terminal departments. Such changes also occurred under adrenaline and prednisolone injections. On the contrary, the decrease in glycemia and cell zinc content is induced by pilocarpine injections. The data obtained indicate the role of sympato-adrenale system in regulation of cell zinc metabolism. The increase in cell zinc content under acute stress is accompanied by decrease of given metal concentration in blood plasma. This situation is evidently connected with zinc dislocation from the plasma into the cells. Zinc content changes in the cells of experimental animals were in conformity with their secretory material quantity changes, indicating possible functional connections of both components in the cells.

Kyiv National Shevchenko University Zaporizhzhya National University

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Авцын А.П., Жаворонков А.А., Риш М.А., Строчкова Л.С. Микроэлементозы человека. – М.: Медицина, 1991. – 496 с.
2. 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.
3. Браун А.Д., Моженок Т.П. Неспецифический адаптационный синдром клеточной системы. – Л.: Наука, 1987. – 232 с.
4. Войнар А.И. Биологическая роль микроэлементов в

организме животных и человека. – М.: Высш. школа, 1960. – 544 с.

5. Григорова Н.В. Вплив екстремальних факторів на вміст цинку в клітинах: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Сімферополь, 2002. – 20 с.
6. Єщенко В.А. Гистохимическое исследование цинка // Цитология. – 1978. – **20**, №8. – С. 927–933.
7. Лукин А.М., Петрова Г.С., Смирнова К.А., Чернышева Т.В. Сульфарсазен // Методы анализа химических реактивов и препаратов. – М.: ИРЕА, 1964. – №9. – С.81–86.
8. Панин Л.Е. Биохимические механизмы стресса. – Новосибирск: Наука, 1983. – 234 с.
9. Соколовский В.В. Гистохимические исследования в токсикологии. – Л.: Медицина, 1971. – 172 с.
10. Хейхоу Ф., Квагино Д. Гематологическая цитохимия. – М.: Медицина, 1983. – 320 с.
11. 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.
12. Bray T.M., Bettger W.J. The physiological role of zinc as an antioxidant // Free Radic. Biol. Med. – 1990. – **8**. – P. 281–291.
13. Brocardo P.S., Pandolfo P., Takahashi R.N. et al. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in the cerebral cortex and hippocampus following acute exposure to malathion and / or zinc chloride // Toxicology. – 2005. – **207**, №2. – P.283–291.
14. Harada T., Koyama I., Matsunaga T. et al. Characterization of structural and catalytic differences in rat intestinal alkaline phosphatase isozymes // FEBS J. – 2005. – **272**, №10. – P. 2477–2486.
15. Nieves J.W. Osteoporosis: the role of micronutrients // Amer. J. Clin. Nutr. – 2005. – **81**, №5. – P. 1232–1239.
16. Shin S.J., Lee H.S., Kwon S.T., Kwak S.S. Molecular characterization of a cDNA encoding cooper/zinc superoxide dismutase from cultured cells of Manihot esculenta // Plant Physiol. Biochem. – 2005. – **43**, №1. – P. 55–60.
17. Story S.V., Shah C., Jenney F.E. Jr., Adams M.W. Characterization of a novel zinc – containing, lysine – specific aminopeptidase from the hyperthermophilic archaeon Pyrococcus furiosus // J. Bacteriol. – 2005. – **187**, №6. – P. 2077–2083.
18. Tudor R., Zalewski P.D., Ratnaik R.N. Zinc in health and chronic disease // J.Nutr. Health Aging. – 2005. – **9**, №1. – P.45–51.
19. Vallee B.L. Zinc: biochemistry, physiology, toxicology and clinical pathology // Biofactors. – 1988. – **1**, №1. – P.31–36.
20. Vallee B.L., Auld D.S. Zinc coordination, function and structure of zinc enzymes and other proteins // Biochemistry. – 1990. – **29**, №24. – P.5647–5659.
21. Varvara G., Traini T., Esposito P. et al. Copper – zinc superoxide dismutase activity in healthy and inflamed human dental pulp // Int. Endocr. J. – 2005. – **38**, №3. – P.195–199.

Київ.нац. ун-т ім. Тараса Шевченка; Запоріз. нац. ун-т

Матеріал надійшов до редакції 02.01.2007