

ВМІСТ ЦИНКУ ТА СЕКРЕТОРНОГО МАТЕРІАЛУ В КЛІТИНАХ ПАНЕТА ЩУРІВ ЗІ СТРЕПТОЗОТОЦИНІНДУКОВАНИМ ДІАБЕТОМ РІЗНОГО СТУПЕНЯ ТЯЖКОСТІ

Н. В. Григорова
Запорізький національний університет
nvgrigorova@ukr.net
N. Hryhorova

Annotation: In rats with streptozotocin-induced diabetes, the content of zinc and secretory material in Paneth cells was determined using the cytochemical reactions of 8-(p-toluenesulfonylamino)-quinoline (8-TSQ) and phloxine. It was established that the degree of severity of zinc deficiency and secretory material in Paneth cells of animals corresponds to the degree of severity of their diabetes.

Key words: streptozotocin-induced diabetes, Paneth cells, zinc, secretory material, degree of severity.

Цинк належить до найбільш важливих і незамінних для життєдіяльності живого організму мікроелементів [1–3]. Цинк виявлений у всіх клітинах і органах вищих тварин і людини, де його кількість коливається в межах 10-200 мкг на 1 г сирової ваги. Координаційне число цинку зазвичай дорівнює 4, що дозволяє йому утворювати зв'язки з чотирма лігандами у вигляді тетраедричних комплексів. Відомі й октаедричні комплекси цинку, в яких беруть участь 6 лігандів [4]. Так, два іони цього металу зв'язують шість молекул інсуліну з утворенням гексамеру, що є депо-формою цього гормону [5–8]. Цинк, що визначається цитохімічно, виявляється у багатьох клітинах, у тому числі базальних відділів кишкових крипт (клітинах Панета). У гранулах панетовських клітин містяться також дефензини – низькомолекулярні (4-kd), цистеїнвмісні катіонні пептиди [9, 10]. Ймовірно, цей метал не тільки утворює комплекс з секреторним матеріалом клітин тонкого кишечника, але й бере участь у його депонуванні, подібно панкреатичних острівців. Враховуючи вище викладене, представляють інтерес дослідження вмісту цинку та секреторного матеріалу в панетовських клітинах тварин при моделюванні цукрового діабету, викликаного введенням стрептозоточину. Кількість металу та секрету в клітинах Панета раніш не визначалась через брак досконалих методів їх цитохімічного виявлення. Розробка в нашій лабораторії реакцій 8-(п-толуолсульфоніламіно)-хіноліну (8-TSX) і модифікації флоксинової реакції дозволила провести такі дослідження.

Мета нашої роботи – визначити вміст цинку та секреторного матеріалу в клітинах Панета у щурів при

стрептозотоциніндукованому діабеті різного ступеня тяжкості.

Матеріалом досліджень слугували проби крові та зрізи підшлункової залози 56 щурів, серед яких контрольними (інтактними) були 16 тварин. Іншим щурам внутрішньоочеревинно вводили стрептозотин у дозі 200 мг/кг у вигляді 2% водного розчину. Через 5 діб після ін'єкції діабетогенної речовини у забитих тварин брали шматочки підшлункової залози для приготування зрізів. Дослідження з використанням лабораторних тварин проводились згідно з вимогами статті 26 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження», «Європейської конвенції про захист хребетних тварин» (Страсбург, 1986) та принципів біоетики.

Для цитохімічного визначення цинку шматочки тонкої кишки фіксували в холодному (+4°C) ацетоні. Після цього шматочки органу доводили до парафіну та заливали в нього. Парафінові зрізи 10 мкм завтовшки обробляли двома ксилолами та спиртами. Депарафіновані зрізи забарвлювали 0,01% ацетономним розчином 8-ТСХ. Після цього промивали дистильованою водою, замикали в гліцерин та розглядали під люмінесцентним мікроскопом (світлофільтри ФС-1, ЖС-18). На препаратах жовто-зелена люмінесценція (показник вмісту цинку в клітинах) визначалась у клітинах Панета.

Для цитохімічного визначення секреторного матеріалу шматочки тонкої кишки фіксували в формаліні протягом 24 год, потім зневоднювали, обробляли ксилолами, сумішшю ксилолу та парафіну, витримували в рідких парафінах та заливали в парафін. Парафінові зрізи 5-10 мкм завтовшки обробляли ксилолами, спиртами, промивали дистильованою водою та забарвлювали 0,5% розчином флоксину. Після забарвлення зрізи промивали дистильованою водою та замикали в гліцерин-желатин. На препаратах у цитоплазмі клітин Панета тонкої кишки визначали червоні гранули. Кількість цих гранул – показник вмісту в клітинах секреторного матеріалу.

За трибальною системою, запропованою В. В. Соколовським, Ф. Хейхоу та Д. Квагліно, оцінювали інтенсивність цитохімічної реакції флоксину [14, 15]. Інтенсивність цитохімічних реакцій 8-ТСХ визначали за допомогою мікрофлуориметра. Вміст цинку оцінювали в мкг/г. Одержані результати статистично опрацьовані за t-критерієм Стьюдента за допомогою програми Statistica, 6.0. Для оцінки ступеня зв'язку між змінами досліджених показників обчислювали коефіцієнт кореляції Пірсона (r).

У клітинах Панета щурів, які складалі контрольну групу, вміст цинку дорівнював $92 \pm 5,9$ мкг/г, а секреторного матеріалу – $1,7 \pm 0,12$ ум.од. При цьому кількість гранул 8-ТСХ відповідала $55 \pm 2,5$, а флоксинофільних гранул – $57 \pm 3,1$.

При важкому діабеті в клітинах Панета щурів спостерігалось

зниження вміст цинку на 68%, секреторного матеріалу – на 65%, а також кількості гранул 8-ТСХ на 42%, флоксифільних гранул – на 37% ($P < 0,001$). У тварин з діабетом середньої важкості зменшувався в клітинах рівень металу на 50%, секрету – на 41% ($P < 0,001$), а кількість цинковмісних і секреторних гранул – відповідно на 29% ($P < 0,001$) і 25% ($P < 0,01$). При легкому діабеті зниження цих показників становило 32% ($P < 0,001$), 24% ($P < 0,01$), 17% і 18% ($P < 0,05$), а у випадку, коли діабет не розвивався, – 18, 12, 9 і 9% ($P > 0,05$). У середньому при стрептозотоциніндукованому діабеті знижувався вміст цинку на 46%, секреторного матеріалу – на 35%, 8-ТСХ - гранул – на 22% ($P < 0,01$), флоксифільних гранул – на 25% ($P < 0,01$). У всіх випадках спостерігається позитивна кореляція змін вмісту цинку та секреторного матеріалу в панетовських клітинах діабетичних тварин, що вказує на наявність між дослідженими компонентами функціонального зв'язку.

Таким чином, чим важче ступінь перебігу стрептозотоциніндукованому діабету, тим більше дефіцит цинку та секреторного матеріалу в клітинах Панета щурів.

Список використаних джерел

1. Tudor R., Zaleski P. D., Ratnaike R. N. Zinc in health and chronic disease. *J. Nutr. Health Aging*. 2005. Vol. 9, № 1. P. 45–51.
2. Shrimpton R., Gross R., Darnton-Hill I. Zinc deficiency: what are the most appropriate interventions? *BMJ*. 2005. Vol. 330. № 7487. P. 347–349.
3. Haase H., Maret W. *Cellular and molecular Biology of metals*. CRC Press. 2010. Vol. 10. 181–212.
4. Зорин С. Н. Экспериментальная характеристика органических комплексов эссенциальных микроэлементов (цинка и селена). *Микроэл. в мед.* 2008. Т. 9, № 1, 2. С. 16–17.
5. Dehghany J., Hoboth P., Ivanova A. A spatial model of insuline-granule dynamics in Pancreatic β -cells. *Traffic*. 2015. Vol. 8. P. 797–813.
6. Yang Y. Li. Zinc and insulin in pancreatic beta-cells. *Endocrine*. 2014. Vol. 45. P. 178–189.
7. Chimienti F. Zinc pancreatic islet cell function and diabetes: new insights into an old story. 2013. *Nutr. Res. Rev.* Vol. 26. P. 1–11.
8. Tansen J., Karges W., Rink L. Zinc and Diabetes – clinical links and molecular mechanisms. *J. Nutr. Biochem.* 2009. Vol. 20. P. 399–417.
9. Будихина А. С., Пинегин Б. В. Дефензины – мультифункциональные катионные пептиды человека. *Иммунология, аллергология, инфектология*. 2008. № 2. С. 31–40.
10. Sahl H. G., Pag U., Bonness S. Mammalian defensins: structures and mechanism of antibiotic activity. *J. Leukoc. Biol.* 2005. Vol. 77, № 4. P. 466–475.