

# ФІЗІОЛОГІЯ ЛЮДИНИ І ТВАРИН

УДК 669.5:61

**Н. В. Григорова**

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

## **ВИЗНАЧЕННЯ ЦИНКУ, МАГНІЮ ТА ІНСУЛІНУ В ПАНКРЕАТИЧНИХ ОСТРІВЦЯХ РІЗНИХ ВИДІВ ТВАРИН**

*Інсулін, голодування, магній, навантаження глюкозою, острівці Лангерганса, цинк*

Інсулін є специфічним продуктом (гормоном)  $\beta$ -клітин острівців Лангерганса [4], в яких присутній цинк [2, 5]. Відомо, що два іони цинку здатні зв'язати шість молекул інсуліна [11, 15, 17-19]. Допускають, що гексамер, який при цьому утворюється, накопичується в секреторних гранулах («депо-форма» гормона) вказаних клітин [2, 3, 10]. Є чимало літературних даних щодо клітинно-молекулярних механізмів інкреторної функції підшлункової залози [8, 9, 12-14, 16, 20]. Значення магнію для функціонування  $\beta$ -інсуліноцитів невідоме. На відміну від кальцію, який присутній у нем'язових клітинах у низьких концентраціях, магній здатний накопичуватися в них у значній кількості [1]. Розробка в нашій лабораторії нових, досконалих методів цитохімічного визначення цинку та магнію у панкреатичних острівцях тварин і людини відкриває шляхи до вирішення згаданих проблем.

Насамперед, необхідно порівняти розподіл в острівцях Лангерганса інсуліна та згаданих металів у людини та деяких видів лабораторних тварин. Також становлять інтерес порівняльні дослідження змін вмісту трьох компонентів у панкреатичних  $\beta$ -клітинах за певних екстремальних впливів на організми (голодування, навантаження глюкозою), які змінюють функціональний стан цих клітин.

### **Матеріал і методика досліджень**

Матеріалом досліджень слугували шматочки підшлункової залози 15 чоловіків і 185 експериментальних тварин різних видів (собаки, кішки, щурі, кролі, миші, морські свинки, хом'яки, голуби, ящірки). В окремих серіях досліджень миші голодували 12 годин, а щурі – 1 добу. Глюкозу вводили внутрішньочеревинно в дозі 10 г/кг. Мишей і щурів забивали після закінчення терміну голодування та через 2 години після ін'єкції глюкози.

Для визначення глікемії кров брали у людини з пальця; у собак, котів, кролів, хом'яків, морських свинок – з вуха; у мишей і ящірок – з хвоста; у голубів – з підкрильцевої вени. Шматочки підшлункової залози фіксували в ацетоні, рідині Буена, їх також використовували для приготування заморожених зрізів завтовшки 30 – 60 мкм.

# ФІЗІОЛОГІЯ ЛЮДИНИ І ТВАРИН

Свіжозаморожені зрізи залози занурювали на 0,5 – 1 хвилину в 0,01 % спиртовий розчин хлортетрацикліну (ХТЦ), промивали протягом 5 хвилин у дистильованій воді та розглядали під люмінесцентним мікроскопом, оснащеним конденсором темного поля. Для збудження люмінесценції застосовували світлофільтр ФС-1, як захисний (окулярний) використовували світлофільтр із скла ЖС-18. Присутність магнію в клітинах визначали за жовто–зеленим світінням.

Шматочки залози фіксували в холодному ацетоні протягом 12 годин при температурі 4°C, потім їх витримували в двох розчинах ксилолу по 15 хвилин у кожному, суміші 50 % парафіну та 50 % ксилолу (30 хвилин) при температурі 37°C, у двох рідких парафінах (по 2 години в кожному) при температурі 56°C та заливали в парафін. Парафіновані зрізи завтовшки 10 мкм витримували в двох розчинах ксилолу (по 3 хвилини в кожному), двох розчинах ацетону (по 3 хвилини в кожному). На зрізи наносили на 1 хвилину 0,01 % ацетоновий розчин 8 - (п - толуолсульфоніламіно) - хіноліну (8 - ТСХ), після чого їх промивали дистильованою водою протягом 5 хвилин, поміщали в гліцерин і розглядали під люмінесцентним мікроскопом (світлофільтри ФС-1 і ЖС-18). На препаратах цинк виявляли за жовто–зеленим світінням клітин панкреатичних острівців.

Фіксацію шматочків залози в рідині Буена проводили протягом 1 доби. Для приготування фіксатора змішували 10 мл насиченого розчину пікринової кислоти, 5 мл нейтрального формаліна, 1 мл крижаної оцтової кислоти. Фіксовані шматочки підшлункової залози проводили через серію спиртів зростаючої міцності (70° - 4 години; 80 ° - 4 години; 90° - 4 години; 96° - 4 години; абсолютний – 4 години). Потім шматочки витримували в двох розчинах ксилола, суміші ксилола і парафіна, двох рідких парафінах і заливали в парафін, як описано вище.

Зрізи завтовшки 5 мкм забарвлювали альдегідфуксином і гематоксилін-флоксином [4]. У першому випадку в цитоплазмі β-інсуліноцитів виявляли синьо-фіолетову зернистість – показник вмісту в них інсуліну, у другому – в цитоплазмі клітин визначали червону зернистість.

Інтенсивність цитохімічних реакцій 8 – ТСХ, ХТЦ, альдегідфуксину оцінювали за бальною системою, запропонованою В.В. Соколовським [6], а також Ф.Хейхоу, Д.Квагліно [7]. За один бал брали слабо позитивну, два бали – помірну, три бали – виражену за інтенсивністю реакцію. При підрахунку на 100 клітинах виводили середню арифметичну величину ( $\bar{X}$ ), обчислювали похибку (m) і показник вирогідності (p).

## Результати дослідження та їх оговорення

Рівень цукру в крові у людини та досліджуваних тварин у нормі коливається в межах 5,2 – 8,6 ммоль/л. У людей, собак, кішок, кролів і щурів величини глікемії дещо нижчі, ніж у мишей, морських свинок, хом'яків, ящірок, голубів (табл.1).

Таблиця 1.

Глікемія, інтенсивність цитохімічних реакцій 8–ТСХ, ХТЦ, альдегідфуксину в панкреатичних β-клітинах у різних видів тварин ( $\bar{X} \pm m$ )

Людина і назви тварин	Цукор крові, ммоль/л	Інтенсивність реакції, ум.од.		
		8 - ТСХ	ХТЦ	альдегід-фуксину
1	2	3	4	5
Люди (n=15)	5,4 ± 0,29	1,9 ± 0,13	0,7 ± 0,06	1,4 ± 0,10
Собаки (n=13)	5,3 ± 0,25	1,4 ± 0,12	0,8 ± 0,07	1,1 ± 0,09
Кішки (n=11)	5,2 ± 0,21	1,6 ± 0,14	0,8 ± 0,09	1,2 ± 0,11

## ФІЗІОЛОГІЯ ЛЮДИНИ І ТВАРИН

1	2	3	4	5
Щурі (n=17)	5,6 ± 0,24	0,5 ± 0,05	1,3 ± 0,11	1,6 ± 0,14
Кролі (n=11)	5,7 ± 0,21	2,0 ± 0,14	0,2 ± 0,05	1,3 ± 0,07
Миші (n=18)	6,0 ± 0,27	1,9 ± 0,16	1,3 ± 0,10	1,4 ± 0,14
Хом'яки (n=12)	6,3 ± 0,32	1,8 ± 0,17	0,1 ± 0,03	1,5 ± 0,13
Морські свинки (n=10)	5,9 ± 0,25	0,1 ± 0,02	0,3 ± 0,04	1,3 ± 0,06
Ящірки (n=21)	5,8 ± 0,22	0,5 ± 0,06	1,0 ± 0,09	0,8 ± 0,05
Голуби (n=16)	8,6 ± 0,44	0,6 ± 0,08	0,9 ± 0,07	0,7 ± 0,04

Виявлено значні відмінності вмісту металів у β-клітинах підшлункової залози. Дуже низькі показники інтенсивності 8 – ТСХ – реакції відзначено у морських свинок. Порівняно мало цинку виявлено у β-клітинах у щурів, ящірок і голубів. Значну кількість цього металу відзначено у людей, кролів, мишей і хом'яків.

Інші співвідношення спостерігаються при визначенні в β-клітинах магнію. Сліди цього металу виявлено у хом'яків, значно менше – у кролів і морських свинок. Помірну кількість магнію встановлено у β-клітинах у останніх видів тварин.

При дослідженні цитохімічної реакції альдегідфуксину значних відмінностей у тварин різних видів не виявлено. У людей, щурів, мишей і хом'яків інсуліну в острівцях Лангергена було дещо більше, ніж у кролів, морських свинок, ще менше його визначалося у собак, кішок, ящірок, голубів. Звертає на себе увагу той факт, що у кролів і хом'яків при відносно високому вмісті цинку в β-клітинах кількість у них магнію досить низька. У α-клітинах острівців кролів виявлялися виражена флоксифілія та велика кількість цинку й магнію. У хом'яків згадані клітини містять більше магнію, ніж клітини β, проте вони практично позбавлені флоксифілії і не містять цинку. Значні флоксифілія і вміст цинку виявлено в клітинах А острівців у щурів, ящірок і голубів. Для мишей характерний значний вміст у β-клітинах усіх трьох компонентів (цинку, магнію, інсуліну). На відміну від мишей інсулінпродукуючі клітини щурів містять мало цинку. У зв'язку з цим цікавими є порівняльні дослідження у даних видів тварин стану β-клітин при екстремальних впливах, які змінюють функціональний стан інсулярного апарату. Результати таких досліджень наведені в таблиці 2.

Рівень цукру в крові при голодуванні знижений у 1,6 раза у мишей і в 1,8 раза у щурів. При навантаженні глюкозою глікемія у мишей підвищується в 2,2 рази, а у щурів – в 2,3 рази.

Вміст цинку в β-інсуліноцитах складає порівняно з контролем у мишей – 137 %, у щурів – 140 %, а в результаті введення глюкози – відповідно 68 % і 60 %.

Кількість магнію в β-клітинах В острівців складає в порівнянні з інтактними тваринами при голодуванні у мишей – 115 %, щурів – 123 %, а при навантаженні глюкозою відповідно – 69 % і 77 %.

Вміст інсуліну в панкреатичних β-клітинах при голодуванні складає порівняно з контролем у мишей – 143 % і щурів – 138 %. Після введення глюкози кількість інсуліну в цих клітинах складає у мишей – 64 % і у щурів – 69 %.

Таблиця 2.

Глікемія, інтенсивність цитохімічних реакцій 8-ТСХ, ХТЦ, альдегідфуксину в панкреатичних β-клітинах у мишей і щурів при голодуванні та навантаженні глюкозою

Група тварин	Цукор крові, ммоль/л	Інтенсивність реакції, ум.од.		
		8 – ТСХ	ХТЦ	альдегід-фуксину
1	2	3	4	5
Миші: інтактні тварини (n=18)	6,0 ± 0,27	1,9 ± 0,16	1,3 ± 0,10	1,4 ± 0,14

## ФІЗІОЛОГІЯ ЛЮДИНИ І ТВАРИН

1	2	3	4	5
тварини, які голодували (n=14)	3,8 ± 0,15***	2,5±0,13***	1,5± 0,09 *	2,0±0,12***
тварини, які отримали глюкозу (n=13)	13,1± 0,53***	1,3±0,11***	0,9± 0,07***	0,9±0,09**
Щурі: інтактні тварини (n=17)	5,6 ± 0,24	0,5 ± 0,05	1,3 ± 0,11	1,6 ± 0,14
тварини, які голодували (n=15)	3,2 ± 0,14***	0,7±0,06**	1,6± 0,08*	2,2±0,16**
тварини, які отримали глюкозу (n=12)	12,8± 0,55***	0,3±0,03**	1,0± 0,07*	1,1±0,08**

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

Наведені дані свідчать про те, що при різних екстремальних впливах, які змінюють функціональний стан інсулярного апарату, спостерігаються схожі зміни вмісту трьох компонентів у β-клітинах підшлункової залози мишей і щурів. Голодування, що знижує інкреторну функцію цих клітин, спричиняє до викликання накопичення в них інсуліну та металів. Зворотні відносини спостерігаються при введенні глюкози - специфічного стимулятора секреції цього гормону. Підсилення інкреторної функції β-клітин призводить до зниження вмісту в них інсуліну та металів.

### Висновки

1. Вміст у панкреатичних β-клітинах цинку та магнію має видові відмінності.
2. При пригніченні інкреторної функції цих клітин накопичення в них інсуліну супроводжувалося підвищенням вмісту цинку та магнію.
3. При підсиленні інкреторної функції β-клітин зниження вмісту в них інсуліну супроводжувалося падінням концентрації металів.
4. Результати досліджень вказують на можливу участь іонів цинку та магнію в інкреторній функції підшлункової залози.

### ЛІТЕРАТУРА

- 1 Альберт А. Избирательная токсичность – М.: Медицина, 1989. – 432 с.
- 2 Балаболкин М.И. Диабетология. – М.: Медицина, 2000. – 671с.
- 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.112-116.
- 4 Гольдберг Е.Д., Єщенко В.А., Бовт В.Д. Сахарный диабет. Эtiологические факторы. - Томск: Изд-во Томск. ун-та, 1993. - 136 с.
- 5 Єщенко В.А. Гистохимическое исследование цинка // Цитология, 1978. – Т.20, - №8. – С.927-933.
- 6 Соколовский В.В. Гистохимические исследования в токсикологии. – Л.: Медицина, 1971. – 172 с.
- 7 Хейхоу Ф.Г.Дж., Квагино Д. Гематологическая цитохимия. – М.: Медицина, 1983. – 320с.
- 8 Barg S. Mechanisms of exocytosis in insulin – secreting B-cells and glucagan-secreting A-cells // Pharmacol. Toxicol, 2003. – Vol.92, - №1. – P.3-13.
- 9 Bataille D. Mechanismes moleculaires de l'insulinosecretion // Diabetes Metab., 2002. – Vol.28, - 6 suppl. – P.4S7 – 4S13.
- 10 Beregova T.V., Eshchenko J.V. Comparative investigation of zinc and secretory material in rat intestinal cells // International Conference “Neuro-humoral and cellular regulatory mechanisms of digestion processes”. – 2003. – P. 3 – 4.
- 11 Chausmer A.B. Zinc, insulin and diabetes // J. Am. Coll. Nutr., 1998. – Vol.17, -№2. – P.109 – 115.
- 12 Efrat S. Regulation of insulin secretion: insights from engineered beta-cell lines // Ann.N.J.Acad.Sci., 2004. – Vol.1014. – P.88 – 96.
- 13 Henquin J.C. Cellular mechanism of insulin secretion // Ann. Endocrinol. (Paris), 2004. – Vol.65, - №1. – P.8.

- 14 Qian W.J., Gee K.R., Kennedy R.T. Imaging of Zn<sup>2+</sup> release from pancreatic B-cells at the level of single exocytotic events // *Anal.Chem.*, 2003. – Vol. 75, - № 14. – P. 3468 – 3475.
- 15 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.
- 16 Rorsman P., Renström E. Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells // *Diabetologia*, 2003. – Vol.46, - №8. – P.1029 – 1045.
- 17 Rosenfeld L. Insulin: discovery and controversy // *Clin.chem.*, 2002. – Vol.48, - №12. – P.2270 – 2288.
- 18 Seale A.P., de Jesus L.A., Kim S.J., Choi J.H., Lim H.B., Hwang C.S., Kim J.S. Development of an automated protein – tyrosine phosphatase 1 B inhibition assay and the screening of putative insulin – enhancing vanadium (IV) and zinc (II) complexes // *Biotechnol. Lett.*, 2005. – Vol. 27, - №4. – P. 221 – 225.
- 19 Song E.S., Daily A., Fried M.G., Juliano M.A., Juliano L., Hersh L.B. Mutation of active site residues of insulin degrading enzyme alters allosteric interactions // *J.Biol.Chem.*, 2005. – №3. – P.175 – 179.
- 20 Yamada S., Komatsu M., Sato Y., Yamanichi K.Y., Kojuma I., Aizawa T., Hashizume K. Time-dependent stimulation of insulin exocytosis by 3', 5' – cyclic adenosine monophosphate in the rat islet beta-cell // *Endocrinology*, 2002. – Vol.143, - №11. – P.4203- 4209.

**Grigorova N.V.**

## **ZINC, MAGNESIUM AND INSULIN DETERMINATION IN PANCREATIC ISLETS IN VARIOUS KINDS OF ANIMALS**

In various kinds of animals (men, dogs, cats, rats, rabbits, mice, hamsters, guinea pigs, lizards and pigeons) zinc, magnesium and insulin content was investigated in pancreatic islets. In experiments on mice and rats the influence was studied of starvation and glucose load on these components content in insulin-producing cells. Data obtained indicate possible role of zinc and magnesium in pancreas incretory function.

Надійшла 17.10.2005 р.

УДК 669.5:61

**Н. В. Григорова, Ю. В. Єщенко,  
В. Д. Бовт, В. М. Омелянчик, В. А. Єщенко**

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

## **ВМІСТ МЕТАЛІВ У В-ІНСУЛОЦИТАХ У МИШЕЙ І ЩУРІВ ПРИ ГІПОФУНКЦІЇ ОСТРІВЦЕВОГО АПАРАТУ ТА ЇЇ КОРЕКЦІЇ**

*Алоксан, інсулін, магній, миші, острівцевий апарат, цинк, щури.*

В організмі людини та тварин важливу роль відіграють метали цинку і магній [9, 12, 16, 17, 22]. Саме від них залежить активність багатьох ферментів [14, 17, 18, 21]. Вони підтримують інтегральну структуру та функцію біомембран [7, 13, 19, 23]. При дії факторів, які пошкоджують клітини, порушується активність у них ферментів [2, 5, 6, 8, 10, 11, 15, 20, 23] і, відповідно, функція біомембран.

Алоксан призводить до вибіркового пошкодження інсулінпродукуючих клітин [1]. У зв'язку з цим, дослідження впливу даного агента на вміст основних компонентів β-клітин острівців – інсуліну,