



УДК 669.5:61

© 2008

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

Функціональні взаємозв'язки інсулярного апарату з гіпокампом

(Представлено членом-кореспондентом НАН України М. Я. Співаком)

The zinc content in cells can serve as an indicator of their functional state. It is shown that zinc concentrations in hippocampal neurons and pancreatic B-cells are decreased after glucose and pilocarpine injections and are increased under starvation, immobilization, and adrenaline and prednisolone injection. The data obtained indicate a functional connection between hippocampus and pancreas insular apparatus.

Інтерес до питання про функціональні взаємозв'язки гіпокампа та панкреатичних острівців обумовлений тим, що електрична стимуляція гіпокампа спричиняє підвищення рівня інсуліну в крові та розвиток гіпоглікемії [1]. У зв'язку з цим заслуговують особливої уваги порівняльні дослідження стану нейронів гіпокампа і панкреатичних клітин В при дії факторів, які впливають на інкреторну функцію підшлункової залози.

Матеріали та методи. У дослідях використані кролі (усього 91 особина). Контрольну групу склали інтактні тварини. Тваринам інших груп вводили такі препарати: глюкозу — 10 г/кг, внутрішньовенно; пілокарпін — 1 мг/кг, підшкірно; адреналін — 0,05 мг/кг, підшкірно; преднізолон — 5–10 мг/кг, внутрішньом'язово. Також тварин піддавали дії таких факторів, як голодування протягом 2 діб та іммобілізація прив'язуванням до станка на 8 год.

У тварин до забою брали кров з вуха для визначення рівня цукру та інсуліну [2]. Кролів забивали через 1–2 год після введення речовин, а також безпосередньо після закінчення терміну голодування та іммобілізації. Шматочки головного мозку та підшлункової залози використовували для цитохімічного дослідження. Досліди виконані при додержанні етичних вимог поводження з тваринами.

Цинк визначали в гіпокампі на заморожених зрізах головного мозку завтовшки 30–60 мкм. На зрізи наносили 0,01%-й ацетоновий розчин 8-(*n*-толуолсульфоніламіно)-хіноліну (8-ТСХ), через 1–5 хв їх промивали дистильованою водою, поміщали в гліцерин і аналізували під люмінесцентним мікроскопом. Для збудження люмінесценції використовували

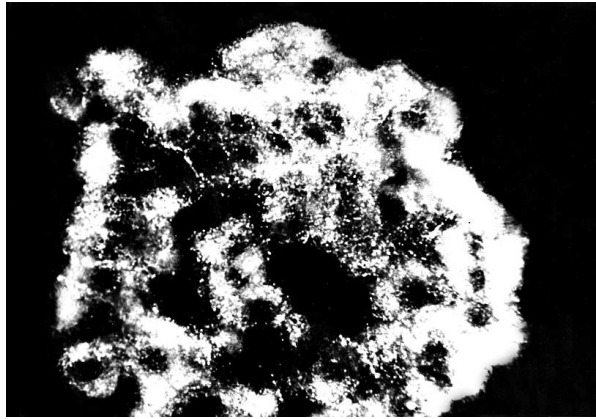


Рис. 1. Цитохімічна реакція 8-ТСХ з цинком у панкреатичному острівці кроля. У цитоплазмі острівцевих клітин визначаються люмінуючі гранули цинку. Зб. $\times 900$

світлофільтр ФС-1, як захисний (окулярний) застосовували світлофільтр зі скла ЖС-18. На препаратах цинк визначали за жовто-зеленою люмінесценцією зубчастої фасції і полів СА2 — СА4 амоніакового рогу.

Для цитохімічного визначення цинку в підшлунковій залозі її шматочки фіксували протягом 3–5 год у холодному (4°C) 70° -му спирті, насиченому сірководнем. Фіксовані шматочки зневоднювали в серії спиртів зростаючої концентрації, проводили через ксилоли, суміші парафіну та ксилолу, рідкі (56°C) парафіни та заливали в парафін [3].

Зрізи завтовшки 10 мкм депарафінували обробкою їх у ксилолах, спиртах, дистильованій воді, флуорохромували протягом 1 хв ацетоновим розчином 8-ТСХ, промивали дистильованою водою, поміщали в гліцерин і аналізували під люмінесцентним мікроскопом як вказано вище. На препаратах у цитоплазмі панкреатичних клітин визначали гранули, які люмінесціювали жовто-зеленим світлом (рис. 1).

Для цитохімічного визначення інсуліну шматочки підшлункової залози фіксували протягом 24 год у рідині Буена, проводили через серію спиртів зростаючої міцності, ксилоли, суміші ксилолу з парафіном, рідкі парафіни і поміщали в парафін. Зрізи підшлункової залози завтовшки 5–10 мкм депарафінували, витримували в окислювачі, відновнику, забарвлювали 0,25%-м спиртовим розчином альдегідфуксину [2]. На препаратах у цитоплазмі панкреатичних В-клітин визначали синьо-фіолетову зернистість, кількість якої була показником вмісту інсуліну в клітинах.

Інтенсивність цитохімічних реакцій 8-ТСХ і альдегідфуксину оцінювали за трибальною системою, запропонованою В.В. Соколовським [4], а також Ф. Хейхоу і Д. Квагліно [5]. За один бал приймали слабопозитивну, два бали — помірну, три бали — виражену за інтенсивністю реакцію. Математичну обробку даних проводили за Стьюдентом. Визначали середню арифметичну величину \bar{X} , похибку m , показник вірогідності p . У ряді випадків підраховували коефіцієнт кореляції ($r \pm m_r$).

Результати дослідження та їх обговорення. У контрольних (інтактних) кролів рівень цукру в крові становив ($5,7 \pm 0,24$) ммоль/л, концентрація інсуліну в крові дорівнювала ($13,4 \pm 1,28$) мкМО/мл, інтенсивність цитохімічних реакцій альдегідфуксину становила ($1,3 \pm 0,10$) ум. од. (табл. 1).

При застосуванні експериментальних факторів впливу концентрація цукру в крові кролів змінювалась таким чином: підвищувалась після введення глюкози — на 81% ($p < 0,001$),

адреналіну — на 65% ($p < 0,001$), преднізолону — на 61% ($p < 0,001$), після іммобілізації — на 49% ($p < 0,01$) і знижувалась після введення пілокарпіну — на 39% ($p < 0,001$) та після голодування — на 37% ($p < 0,001$).

Вміст інсуліну в крові підвищувався на 40% ($p < 0,01$) після введення глюкози та на 51% ($p < 0,01$) після ін'єкції пілокарпіну. Зниження концентрації цього гормону в крові відбувалося при введенні адреналіну — на 54% ($p < 0,001$), преднізолону — на 48% ($p < 0,001$), при голодуванні — на 57% ($p < 0,01$) та іммобілізації — на 53% ($p < 0,01$) (див. табл. 1).

Вміст інсуліну в панкреатичних клітинах В знижувався після ін'єкції глюкози — на 38% ($p < 0,001$) та пілокарпіну — на 54% ($p < 0,001$) і підвищувався після введення адреналіну — на 31% ($p < 0,001$), преднізолону — на 38% ($p < 0,001$), при голодуванні — на 31% ($p < 0,001$) та іммобілізації — 38% ($p < 0,001$).

Таким чином, глікемія була підвищена після введення глюкози, контрінсулярних речовин (адреналіну, преднізолону), іммобілізації та знижена після голодування та ін'єкції пілокарпіну. В останніх двох випадках мало місце падіння її рівня. Вміст інсуліну в клітинах В зменшувався за дії глюкози та пілокарпіну і зростав у всіх інших випадках. Отже, секреторна активність В-інсулоцитів підвищувалась під впливом глюкози та пілокарпіну або зменшувалась при введенні контрінсулярних гормонів (адреналіну, преднізолону), а також при стресових впливах (голодуванні, іммобілізації).

У табл. 2 наведені дані вмісту цинку в панкреатичних клітинах В і гіпокампі. У контрольних (інтактних) кролів інтенсивність цитохімічної реакції 8-ТСХ становила ($1,9 \pm 0,15$) ум. од. в В-інсулоцитах і ($2,0 \pm 0,12$) ум. од. у нейронах гіпокампа.

Таблиця 1. Вміст цукру та інсуліну в крові, цитохімічна реакція альдегідфуксину в панкреатичних клітинах В у кролів при введенні глюкози, пілокарпіну, адреналіну, преднізолону, а також при голодуванні та іммобілізації ($\bar{X} \pm m$)

Група тварин	Цукор крові, ммоль/л	Інсулін крові, мкМО/мл	Інтенсивність реакції, ум. од.
Контроль ($n = 15$)	$5,7 \pm 0,24$	$13,4 \pm 1,28$	$1,3 \pm 0,10$
Глюкоза ($n = 12$)	$10,3 \pm 0,42^{***}$	$18,7 \pm 1,36^{**}$	$0,8 \pm 0,05^{***}$
Пілокарпін ($n = 14$)	$3,5 \pm 0,12^{***}$	$20,3 \pm 2,12^{**}$	$0,6 \pm 0,03^{***}$
Адреналін ($n = 11$)	$9,4 \pm 0,46^{***}$	$6,2 \pm 0,75^{***}$	$1,7 \pm 0,11^{**}$
Преднізолон ($n = 13$)	$9,2 \pm 0,41^{***}$	$7,1 \pm 0,86^{***}$	$1,8 \pm 0,10^{**}$
Голодування ($n = 14$)	$3,6 \pm 0,13^{***}$	$5,7 \pm 0,64^{***}$	$1,7 \pm 0,10^{**}$
Іммобілізація ($n = 12$)	$8,5 \pm 0,39^{**}$	$6,3 \pm 0,61^{***}$	$1,8 \pm 0,12^{***}$

** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$.

Таблиця 2. Інтенсивність цитохімічної реакції 8-ТСХ у панкреатичних клітинах В і гіпокампі кролів при введенні глюкози, пілокарпіну, адреналіну, преднізолону, при голодуванні та іммобілізації ($\bar{X} \pm m$)

Група тварин	Інтенсивність реакції, ум. од.		$r \pm m_r$
	В-інсулоцити	Гіпокамп	
Контроль ($n = 15$)	$1,9 \pm 0,15$	$2,0 \pm 0,12$	$0,62 \pm 0,094^{***}$
Глюкоза ($n = 12$)	$1,4 \pm 0,12^*$	$1,5 \pm 0,11^{**}$	$0,84 \pm 0,041^{***}$
Пілокарпін ($n = 14$)	$1,3 \pm 0,16^{**}$	$1,2 \pm 0,09^{***}$	$0,57 \pm 0,119^{**}$
Адреналін ($n = 11$)	$2,6 \pm 0,14^{***}$	$2,5 \pm 0,13^{**}$	$0,63 \pm 0,112^{**}$
Преднізолон ($n = 13$)	$2,5 \pm 0,16^{**}$	$2,6 \pm 0,15^{***}$	$0,68 \pm 0,073^{***}$
Голодування ($n = 14$)	$2,4 \pm 0,13^*$	$2,5 \pm 0,14^{**}$	$0,72 \pm 0,104^{***}$
Іммобілізація ($n = 12$)	$2,5 \pm 0,15^{**}$	$2,7 \pm 0,15^{***}$	$0,73 \pm 0,096^{***}$

* $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$.

Експериментальні фактори, що застосовувались нами, справляли різну дію на досліджуваний показник. Так, вміст цинку в В-клітинах острівців знижувався після введення глюкози — на 26% ($p < 0,05$) та пілокарпіну — на 32% ($p < 0,01$) і підвищувався після введення адреналіну — на 37% ($p < 0,001$), преднізолону — на 32% ($p < 0,01$), при голодуванні — на 26% ($p < 0,05$), при іммобілізації — на 32% ($p < 0,01$). Коефіцієнт кореляції між вмістом інсуліну та цинку в панкреатичних клітинах В при різних експериментальних впливах коливався в межах $(0,40 \pm 0,075) - (0,61 \pm 0,112)$ ($p < 0,001$; $p < 0,01$), що вказує на зв'язок двох компонентів у клітинах.

У гіпокампі вміст цинку зменшувався при введенні глюкози — на 25% ($p < 0,01$) та пілокарпіну — на 40% ($p < 0,01$). Концентрація цього металу в нейронах гіпокампа зростала після ін'єкції адреналіну — на 25% ($p < 0,01$), преднізолону — на 30% ($p < 0,001$), при голодуванні — на 25% ($p < 0,01$), при іммобілізації — на 35% ($p < 0,001$). Коефіцієнт кореляції $r \pm m_r$ між змінами вмісту цинку в В-інсулоцитах і нейронах гіпокампа коливався в межах $(0,57 \pm 0,119) - (0,84 \pm 0,041)$ ($p < 0,01$; $p < 0,001$) (див. табл. 2), що вказує на функціональний зв'язок двох видів клітин. Відомо, що концентрація цинку в клітинах може бути показником їх функціонального стану [3].

При введенні в гіпокамп конвульсанта, який стимулює його нейромедіаторну функцію, ми спостерігали зниження вмісту цинку в гіпокампальних нейронах і В-інсулоцитах, що також свідчить про функціональний зв'язок гіпокампа з інкреторною функцією підшлункової залози.

На підставі літературних [6] та отриманих нами даних можна припустити, що підвищення вмісту цинку в нейронах гіпокампа при стресі викликає їх гальмування, внаслідок чого активується гіпоталамо-гіпофізарно-надниркова система, що призводить, у свою чергу, до пригнічення інкреторної функції В-інсулоцитів шляхом збільшення концентрації в них цинку. Отже, накопичення цинку в гіпокампі та інсулярному апараті при дії екстремальних факторів обумовлює розвиток стресової реакції. Контрінсулярні стресові гормони (катехоламіни, глюкокортикоїди) підвищують вміст цинку в клітинах, причому це накопичення зв'язано із синтезом білка металотіонеїну [7].

1. *Seto K., Otsuka H., Kawakami M.* Influence of electrical stimulation of the limbic structure on insulin level in rabbits plasma // *Exp. Clin. Endocrinol.* – 1983. – **81**, No 3. – P. 347–349.
2. *Гольдберг Е. Д., Ещенко В. А., Бовт В. Д.* Сахарный диабет. Этиологические факторы. – Томск: Изд-во Томск. ун-та, 1993. – 136 с.
3. *Берегова Т. В., Єщенко Ю. В.* Зміни вмісту цинку в клітинах при різних функціональних станах інсулярного апарата підшлункової залози // *Вісн. Запоріз. держ. ун-ту.* – 2003. – № 1. – С. 112–116.
4. *Соколовский В. В.* Гистохимические исследования в токсикологии. – Ленинград: Медицина, 1971. – 172 с.
5. *Хейхоу Ф., Кваглино Д.* Гематологическая цитохимия. – Москва: Медицина, 1983. – 320 с.
6. *Ониани Т. Н.* Интегративная функция лимбической системы. – Тбилиси: Мецниереба, 1980. – 302 с.
7. *Авцын А. П., Жаворонков А. А., Рши М. А., Строчкова Л. С.* Микроэлементозы человека (этиология, классификация, органопатология). – Москва: Медицина, 1991. – 496 с.