



УДК 591.1:591.046:616. 379-008.69

Н. В. Григорова, М. А. Кузьміна, А. К. Карпов
**ВПЛИВ АДРЕНАЛІНУ, ПРЕДНІЗОЛОНУ ТА ПІЛОКАРПІНУ НА
ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ПАНКРЕАТИЧНИХ ОСТРІВЦІВ І ТИМУСА
ЗОЛОТИСТИХ ХОМ'ЯЧКІВ**

*Запорізький національний університет
вул. Жуковського, 66, м. Запоріжжя, МСП-41, 69600, Україна
e-mail: marinka.kuzmina@rambler.ru*

Досліджено вплив адреналіну, преднізолону та пілокарпіну на рівень глюкози в крові, вміст інсуліну та цинку в панкреатичних клітинах В, а також цинку в тимусних епітеліальних клітинах (ТЕК) золотистих хом'ячків *Mesocricetus auratus*. Кількість цинку в В-інсулоцитах і ТЕК визначали за допомогою високоселективної люмінесцентної реакції 8-(п-толуолсульфоніламіно)-хіноліну. Встановлено, що при дії адреналіну та преднізолону відбувається розвиток гіперглікемії, накопичення цинку та інсуліну в острівцевих В-клітинах і цинку в клітинах тимуса, що свідчить про пригнічення функціонального стану цих клітин. Після введення пілокарпіну, навпаки, спостерігалися гіпоглікемія та зменшення кількості досліджених внутрішньоклітинних компонентів, що вказує на підсилення функціональної активності В-інсулоцитів і ТЕК. Проведений кореляційний аналіз підтверджує припущення про наявність функціонального зв'язку між цинком та інсуліном в панкреатичних клітинах В, а також між дослідженими клітинами підшлункової і вилочкової залоз.

Ключові слова: адреналін, глікемія, інсулін, панкреатичні острівці, пілокарпін, преднізолон, тимус, цинк.

Н. В. Григорова, М. А. Кузьміна, А. К. Карпов
**ВЛИЯНИЕ АДРЕНАЛИНА, ПРЕДНИЗОЛОНА И ПИЛОКАРПИНА НА
ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПАНКРЕАТИЧЕСКИХ ОСТРОВКОВ И
ТИМУСА ЗОЛОТИСТЫХ ХОМЯЧКОВ**

*Запорожский национальный университет
ул. Жуковского, 66, г. Запорожье, МСП-41, 69600, Украина
e-mail: marinka.kuzmina@rambler.ru*

Исследовано влияние адреналина, преднизолон и пилокарпина на уровень глюкозы в крови, содержание инсулина и цинка в панкреатических клетках В, а также цинка в тимусных эпителиальных клетках (ТЭК) золотистых хомячков *Mesocricetus auratus*. Количество цинка в В-инсулоцитах и ТЭК определяли с помощью высокоселективной люминесцентной реакции 8-(п-толуолсульфонилиамино)-хинолина. Установлено, что при воздействии адреналина и преднизолон происходит развитие гипергликемии, накопление цинка и инсулина в островковых В-клетках и цинка в клетках тимуса, что свидетельствует об угнетении функционального состояния этих клеток. После введения пилокарпина, наоборот, наблюдались гипогликемия,

уменьшение количества исследованных внутриклеточных компонентов, что указывает на усиление функциональной активности В-инсулоцитов и ТЭК. Проведенный корреляционный анализ подтверждает предположение о наличии функциональной связи между цинком и инсулином в панкреатических клетках В, а также между исследованными клетками поджелудочной и вилочковой желез.

Ключевые слова: адреналин, гликемия, инсулин, панкреатические островки, пилокарпин, преднизолон, тимус, цинк.

N. V. Grigороva, M. A. Kuzmina, A. K. Karpov

**THE INFLUENCE OF ADRENALINE, PREDNISOLONE AND PILOCARPINE ON
THE FUNCTIONAL STATUS OF PANCREATIC ISLETS AND THYMUS OF
GOLDEN HAMSTERS**

Zaporozhye National University

E-mail: marinka.kuzmina@rambler.ru

The article discovered the effect of Adrenaline, Prednisolone, and Pilocarpine on blood glucose level, insulin, and zinc in B pancreatic cells and thymic epithelial cells (TEC) of golden hamsters *Mesocricetus auratus*. The amount of zinc in the B-insulocytes and TEC was determined using highly selective luminescent reaction 8-(p-toluenesulfonylamino)-quinoline. It was found that the hyperglycemia development, accumulation of zinc and insulin in the islet B-cells together with zinc accumulation in thymus cells was descended under the Adrenaline and Prednisolone influence that indicates the inhibition of the cell's functional state. On the contrary Pilocarpine injection led to hypoglycemia, reduction of research intracellular components that indicates the enhancement of the B-insulocytes and TEC functional activity.

The correlation analysis confirms the assumption of a functional link between zinc and insulin in pancreatic B cells, as well as between research cells of pancreas and thymus glands.

Key words: Adrenaline, glycemia, insulin, islet tissues, Pilocarpine, Prednisolone, thymus, zinc.

Панкреатичні клітини В і тимусні епітеліальні клітини (ТЕК) здатні акумулювати цинк, доступний для взаємодії з хелантом-хромофором 8-(п-толуолсульфоніламіно)-хіноліном (8-ТСХ) (Берегова, 2007; Григорова, 2013). У панкреатичних острівцях основна частина цинку припадає на частку інсулінпродукуючих клітин (Гольдберг, 1993). Електронномікроскопічно він виявляється в секреторних гранулах зазначених клітин. При дослідженні за допомогою рентгенструктурного аналізу встановлено, що одна гексамерна одиниця кристалічного цинк-інсуліну складається з трьох димерів, згорнутих навколо вісі, на якій розташовані два атоми цинку (Балаболкин, 2000; Seale, 2005). Вважають, що такий комплекс є формою депонування гормону в зрілих секреторних гранулах В-інсулоцитів. Проінсулін, так само як й інсулін, утворює димери та цинковмісні гексамери (Балаболкин, 2000). Доведено, що вміст цинку та інсуліну в панкреатичних клітинах В є індикатором їх функціонального стану (Берегова, 2007). У ТЕК, подібно до інсулінпродукуючих В-клітин, цинк



акумулюється в секреторних гранулах і, можливо, бере участь у депонуванні секреторного матеріалу. Відомо, що цинк входить до складу тимуліну-пептидного гормону, що синтезується ТЕК. Він зв'язується з тимуліном у співвідношенні 1:1. Цинк є необхідним елементом трансформації претимуліну в тимулін (Bach, 1998; Сергеев, 2000). Постачальником Zn^{2+} для тимуліну слугує металотіонеїн, який продукується ТЕК (Savino, 1984). Цитохімічна реакція на цей метал може слугувати показником функціонального стану ТЕК.

Мета роботи – вивчення функціональних зв'язків між ТЕК і В-інсулоцитами, а також між внутрішньоклітинними цинком та інсуліном. Для досягнення мети було проведено дослідження рівня цукру в крові, цинку та інсуліну в панкреатичних клітинах В, а також цинку в ТЕК у золотистих хом'ячків (*Mesocricetus auratus*), яким вводили адреналін, преднізолон і пілокарпін. Ці речовини, як відомо, впливають на секреторну активність клітин.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У досліджах було використано 48 статевозрілих золотистих хом'ячків віком 5-6 місяців, масою 35-45 г. Преднізолон вводили тваринам внутрішньом'язово, а пілокарпін і адреналін – підшкірно в дозах 10, 1 і 0,05 мг/кг відповідно. Через 2 год після ін'єкцій адреналіну та преднізолону та через 0,5-1 год. після введення пілокарпіну у тварин за життя брали кров з вуха чи хвоста для визначення рівня глюкози в крові модифікованим методом Хаггедорна-Йенсена, а після забою вилучали шматочки вилочкової залоз. На всіх етапах експерименту дотримувалися вимог «Загальні етичні принципи експериментів на тваринах».

Для цитохімічного визначення інсуліну в панкреатичних клітинах В шматочки підшлункової залози фіксували в рідині Буена протягом 24 год. Потім шматочки проводили через спирти зростаючої міцності (70 °, 80 °, 90 °, 95 °, 100 ° - по 4 год у кожному), два ксилоли (по 15 хв. у кожному), суміш 50% ксилолу та 50% парафіну (по 30 хв. при температурі 40 °С), два рідкі парафіни (по 1,5 год у кожному при 56 °С) і заливали в парафін. Депарафінування зрізів проводили шляхом їх послідовного витримання в двох ксилолах (по 3 хв. у кожному), спиртах (100 °, 96 °, 90 °, 80 °, 70 ° по 3 хв. у кожному), дистильованій воді (5 хв.).

Парафіновані зрізи 5 мкм завтовшки проходили процедуру окислення-відновлення, після чого їх промивали дистильованою водою 5 хв. і фарбували впродовж 6 хв. 0,25 % спиртовим розчином альдегідфуксину. На препаратах у цитоплазмі В-клітин острівців виявлялась синьо-фіолетова зернистість. Її кількість слугувала показником вмісту в клітинах інсуліну. Інтенсивність цитохімічної реакції альдегідфуксину оцінювали за трибальною системою (Соколовський, 1971; Хейхоу, 1983).

Для визначення цинку в клітинах використовували високоселективну цитохімічну реакцію 8-(п-толуолсульфоніламіно)-хіноліном (8-ТСХ). Шматочки вилочкової і підшлункової залоз фіксували в 70 ° холодному (при 4 °С) спирті,

насиченому сірководнем. Потім шматочки доводили до парафіну, як описано вище, та заливали в парафін.

Парафіновані зрізи 5 мкм завтовшки обробляли впродовж 3 хв. послідовно в двох ксилолах і спиртах, 5 хв. – 0,1% спиртовим розчином 8-ТСХ, промивали впродовж 1 хв. у гарячому (70 °С) 0,1 N розчині гідроксиду натрію, підсушували на повітрі, замикали в гліцерин і розглядали під люмінесцентним мікроскопом (світлофільтри ФС-1, ЖС-18). На препаратах жовто-зелена люмінесценція виявлялась у ТЕК і В-інсулоцитах.

Підрахунок інтенсивності флуоресценції проводили на 50-100 клітинах за допомогою цитрофлуориметра. Експериментальні дані обробляли з використанням t-критерію Стюдента та критерію Колмагорова-Смірнова за допомогою програми Statistica 6.0. Для оцінки ступеня зв'язку між змінами досліджених показників обчислювали коефіцієнт кореляції Пірсона (r).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У табл. 1 представлені результати досліджень стану панкреатичних острівців у золотистих хом'ячків, які отримали ін'єкції адреналіну, преднізолону та пілокарпіну.

Таблиця. 1. Глікемія, вміст цинку та інсуліну в панкреатичних клітинах В (M±m) та їх взаємозв'язок (r) у золотистих хом'ячків при введенні адреналіну, преднізолону та пілокарпіну

Table. 1. Glycemia, zinc, and insulin content in B pancreatic cells and its correlation after injections of Adrenaline, Prednisolone, and Pilocarpine in Golden hamsters

Група тварин Group of animals	Глюкоза в крові, ммоль/л Blood Glucose, mmol/l	Цинк В-інсулоцитів, мкг/мл Zinc in B insulocytes, mkg/ml	Інсулін В-інсулоцитів, ум.од. Insulin in B insulocytes, с.у.	r _{3,4}
1	2	3	4	5
Контроль (n=15) Control (n=15)	6,4±0,21	53±3,0	1,4±0,07	0,54*
Тварини, які отримали адреналін (n=12) Animals that received injections of adrenaline (n=12)	10,5±0,44***	67±4,0**	1,8±0,10***	0,58*
Тварини, які	10,2±0,40***	63±3,3*	1,7±0,11*	0,57*



отримали преднізолон (n=10) Animals that received injections of prednisolone (n=10)	Тварини, які отримали пілокарпін (n=11) Animals that received injections of pilocarpine (n=11)	3,7±0,14***	37±3,0***	0,9±0,06***	0,50*
---	--	-------------	-----------	-------------	-------

Примітка: *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001 порівняно з контролем.

Отримані дані свідчать, що під впливом адреналіну в хом'ячків збільшувалась концентрація глюкози в крові на 64 % (P < 0,001). Вміст цинку та інсуліну в клітинах В острівців підвищувався на 26 % (P < 0,01) і 29% (P < 0,001).

Схожі зміни глікемії, вмісту металу та гормону спостерігалися після ін'єкції преднізолону цим тваринам: зростання глікемії складало 59 % (P < 0,001), рівня цинку та інсуліну в панкреатичних острівцях - 18% (P < 0,05) і 21 % (P < 0,05) відповідно. Призначення пілокарпіну, навпаки, призводило до зниження в крові вмісту цукру на 42 % (P < 0,001), в інсулінпродукуючих клітинах цинку – на 30 % (P < 0,001), гормону – на 36 % (P < 0,001).

Отже, у золотистих хом'ячків спостерігалось підвищення глікемії, вмісту цинку та інсуліну в клітинах В острівців при введенні адреналіну, преднізолону, а при введенні пілокарпіну всі три показники були знижені. У всіх випадках встановлена позитивна вірогідна кореляція між змінами рівня металу та гормону в В-інсулоцитах піддослідних тварин, що вказує на зв'язок цих двох компонентів.

На рис. 1 наведені дані впливу симпатоміметика, глюкокортикоїда та холіноміметика на вміст цинку в клітинах вилочкової і підшлункової залоз.

З рис. 1 видно, що в контролі вміст цинку складав 27±2,0 мкг/мл у ТЕК, 53±3,0 мкг/мл – у В-інсулоцитах, при цьому коефіцієнт кореляції дорівнював 0,5 (P < 0,05). Після ін'єкції адреналіну в золотистих хом'ячків кількість металу зростала в ТЕК на 37 % (37±3,0 мкг/мл; P < 0,05), клітинах В острівців – на 26% (67±4,0 мкг/мл; P < 0,01). Коефіцієнт кореляції змін дослідженого показника в клітинах становив 0,49 (P < 0,05).

У тварин, яким вводили преднізолон, рівень цинку збільшувався в клітинах вилочкової залози на 22 % (33±1,7мкг/мл; P < 0,05), а підшлункової залози – на 19

% ($63 \pm 3,3$ мкг/мл; $P < 0,05$). При цьому значення коефіцієнту кореляції становило $0,51$ ($P < 0,05$).

Призначення пілокарпіну, навпаки, знижувало вміст цинку в клітинах тимуса на 26 % ($20 \pm 1,3$ мкг/мл; $P < 0,01$), панкреатичних клітинах В – на 30 % ($37 \pm 3,0$ мкг/мл; $P < 0,001$). Встановлена позитивна кореляція змін металу в ТЕК і В-інсулоцитах ($r = 0,68$; $P < 0,01$).

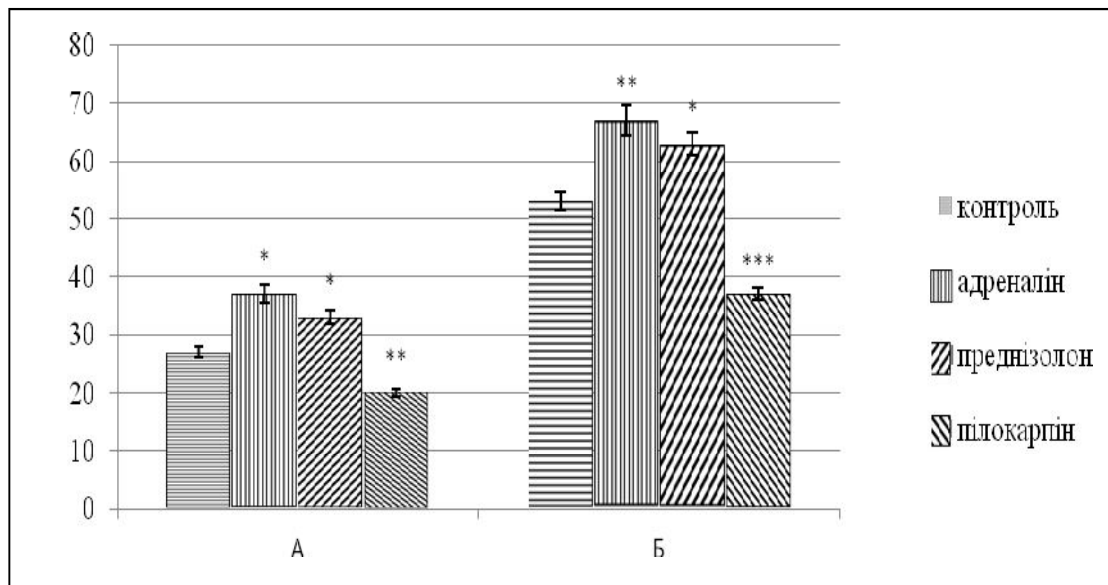


Рис. 1. Вміст цинку (мкг/мл) у ТЕК (А) і В-інсулоцитах (Б) золотистих хом'ячків при введенні адреналіну, преднізолону, пілокарпіну (мкг/мл).

Fig. 1. Zinc content (mkg/ml) in TEC (A) and B insulocytes (Б) of the Golden hamsters after injections of Adrenaline, Prednisolone, and Pilocarpine, mkg/ml.

Таким чином, уведення гормонів наднирників викликає накопичення цинку в клітинах виличкової і підшлункової залоз золотистих хом'ячків, що обумовлено пригніченням їх секреторної активності. Активація секреції клітин тимуса та панкреатичних острівців внаслідок дії пілокарпіну супроводжується втратою ними цього металу.

ВИСНОВКИ

1. Ін'єкції адреналіну та преднізолону викликали в золотистих хом'ячків розвиток гіперглікемії, підвищення вмісту інсуліну в панкреатичних острівцях і цинку в клітинах підшлункової і виличкової залоз, що можна пояснити пригніченням секреторної функції останніх.

2. Під впливом пілокарпіну спостерігається підсилення секреторної активності В-інсулоцитів і ТЕК, що проявляється зниженням рівня глюкози в крові, цинку та інсуліну в острівцях, цинку в тимусі.



3. Проведений кореляційний аналіз свідчить про наявність функціонального зв'язку між цинком та інсуліном в панкреатичних клітинах В, а також між дослідженими клітинами підшлункової і виличкової залоз.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

Берегова Т. В. Визначення вмісту цинку та інсуліну в клітинах при різному функціональному стані інсулярного апарату / Т. В. Берегова, Н. В. Григорова, Ю. В. Єщенко, В. Д. Бовт, В. А. Єщенко // Фізіологічний журнал. – 2007. – Т.53, №4. – С.100-104.

Григорова Н. В. Роль цинку в нейрогуморальних механізмах регуляції функції інсулярного апарату / Н. В. Григорова, В. А. Єщенко // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2013. – Т.61, №1. – С.79-84.

Гольдберг Е. Д. Диагностическое значение селективной цитохимической реакции в гранулоцитах периферической крови / Е. Д. Гольдберг, В. Д. Бовт, В. А. Єщенко // Клин.лаб. диагностика. – 1993. – №3. – С.25-27.

Балаболкин М.И. Диабетология / М.И. Балаболкин. – М.: Медицина, 2000. – 671 с.

Сергеев П.В. Цинкосодержащие препараты как модуляторы иммунной системы / П.В. Сергеев, Н.Л. Шимановский, К.Г. Гуревич // Междунар. мед. журнал. – 2000. – Т.6, №4. – С.99-101.

Соколовский В.В. Гистохимические исследования в токсикологии / В.В.Соколовский. - Л.: Медицина, 1971. – 172 с.

Хейхоу Ф. Гематологическая цитохимия/ Ф. Хейхоу, Д. Кваглино - М.: Медицина, 1983. – 320 с.

Seale A. P. Development of an automated protein-tyrosine phosphatase inhibition assay and the screening of putative insulin-enhancing vanadium (IV) and zinc (II) complexes / A. P. Seale, L. A. de Jesus, S. Y. Kim [et al.] // Biotechnol. Lett. – 2005. – Vol.27, №4. – P.221-225.

Bach J. F. Thymulin, a zinc-dependent hormone / J. F. Bach // Med. Oncol. Tumor. Pharmacother. – 1989. – Vol.6, №1. – H.25-29.

Savino W. Thymic hormone-containing cells. Immunohistological detection of metallothionein within the cells bearing thymulin in human and mouse thymuses / W. Savino, P. Hung, A. Corrigan [et al.] // J. Histochem. Cytochem. – 1984. – Vol.32. – P.942-946.

REFERENCES

- Beregova, T. V., Grigороva, N. V., Eshchenko, J. V., Bovt, V. D., Eshchenko, V. A. (2007). Zinc and insulin content detection in islet of insular apparatus. *Physiological J.* 4 (53), 100-104.
- Grigороva, N. V., Eshchenko, V. A. (2013). Role of zinc in neuro-humoral mechanisms of the insular apparatus function regulation. *Experimental and Clinical Physiology and Biochemistry.* 1 (61), 79-84.
- Goldberg, E. D., Eshchenko, V. A., Bovt, V. D. (1993). *Diabetes mellitus. Etiological factors.* Tomsk: Tomsk University Press.
- Balabolkin, M. J. (2000). *Diabetology.* – Moscow: Medicine.
- Seale, A. P., de Jesus, L. A., Kim, S. J. (2005). Development of an automated protein-tyrosine phosphatase inhibition assay and the screening of putative insulin-enhancing vanadium (IV) and zinc (II) complexes. *Biotechnol. Lett.*
- Bach J. F. (1989). Thymulin, a zinc-dependent hormone. *Med. Oncol. Tumor. Pharmacother.* 1(6), 25-29.
- Sergeev, P. V., Shymanovskiy, N. L., Gurevysh, K. G. (2000). Zinc content preparation. *Internat. Med. J.* 4 (6), 99-101.
- Savino W., Hung, P., Corrigan, A. (1984). Thymic hormone-containing cells. Immunohistological detection of metallothionein within the cells bearing thymulin in human and mouse thymuses. *J. Histochem. Cytochem.* 32, 942-946.



Sokolovskiy, V. V. (1971). Histochemical investigations in toxicology. Leningrad:

Medicine.

Hayhoe, F., Quaglino, D. (1983). Haematological cytochemistry. Moscow: Medicine.

Поступила в редакцію 15.11.2013

Как цитировать:

Григорова, Н.В., Кузьміна, М.А., Карпов, А.К. (2013). Вплив адреналіну, преднізолону та пілокарпіну на функціональний стан панкреатичних островців і тимуса золотистих хом'ячків. *Биологический вестник Мелитопольского государственного педагогического университета имени Богдана Хмельницкого*, 3 (3), 250-258. **crossref** [http://dx.doi.org/10.7905/bbmstu.v0i3\(6\).544](http://dx.doi.org/10.7905/bbmstu.v0i3(6).544)

© Григорова, Кузьміна, Карпов, 2013