

Н.В. Григорова

Розподіл цинку, магнію та міді в гранулоцитах і сироватці крові кролів при введенні речовин, які змінюють функціональний стан кори надниркових залоз і автономної нервової системи

Запорізький національний університет; E-mail: alex_camelotzp@qip.ru

За допомогою біохімічних та цитохімічних методів досліджувався вміст цинку, магнію та міді в гранулоцитах і сироватці крові кролів, яким вводили речовини, що змінюють функціональний стан кори надниркових залоз, симпатoadреналової та парасимпатичної нервової систем. Встановлено, що ін'єкції кролям адреналіну, преднізолону та пілокарпіну викликають різноспрямовані зміни в клітинах і позаклітинному просторі. Спостерігалось вірогідне збільшення кількості цинку на 33–42%, магнію – на 33–50%, а також зменшення міді на 25–50% у гранулоцитах крові тварин, яким вводили гормони надниркових залоз. Під впливом холіноміметика в зернистих лейкоцитах кролів суттєво знижувався вміст цинку на 58%, магнію – на 33%, а міді – зростав на 50%. Протилежна картина спостерігалась в сироватці крові. Призначення адреналіну та преднізолону зумовлювало достовірне зниження концентрації цинку на 20–24%, магнію – 22–33%, а міді – підвищення на 36–43%. Після ін'єкції пілокарпіну зменшення вмісту цинку та магнію становило 28 і 33% ($P < 0,01$) відповідно, а міді – збільшення на 43% ($P < 0,001$). Отримані результати вказують також на синергічні взаємини у клітинах цинку та магнію, але антагоністичні – цих металів з міддю.

Ключові слова: адреналін; преднізолон; пілокарпін; цинк; магній; мідь; гранулоцити; сироватка крові.

ВСТУП

Цинк, магній і мідь є життєво важливими елементами, що входять до складу багатьох ферментів, вітамінів, гормонів, дихальних пігментів [1–6]. Відповідно до своїх фізико-хімічних характеристик вони визначають функціональний стан різних процесів, впливають на активність клітин організму, в тому числі гранулоцитів крові [1–4, 6, 7]. Встановлена роль металів у регуляції активності ферментативних систем лейкоцитів, підтриманні стабільності їх цитолем [1–6, 8–10]. У гранулах базофілів і мастоцитів знаходиться цинк, іони якого стабілізують клітинні мембрани та запобігають дегрануляції мастоцитів за рахунок утворення меркап-

тидів з тіоловими групами протеїнів мембран та пригнічення ферментів аденозинтрифосфатази і фосфоліпази A_2 , що контролюються цинком [3, 11]. Показаний гальмівний вплив іонів цинку на активність лізоциму [6, 11]. Вони також пригнічують виділення з клітин глютаміну та лізосомальних ферментів, знижують фагоцитуючу здатність гранулоцитів. При цьому фагоцитарна функція клітин страждає меншою мірою, ніж їх хемотаксис. Доведено, що поглинальна активність фагоцита безпосередньо залежить від кількості в ньому мідьвмісного білка [3, 9]. Цинк у концентрації 10^{-6} – 10^{-4} моль/л сповільнює вивільнення гістаміну з гранулоцитів [3, 6, 11, 12]. На здатність клітин накопичувати та секретувати гістамін впливає і магній

© Н.В. Григорова

[1–4, 13]. При його недостатності кількість поліморфоядерних і еозинофільних клітин у крові знижується [4, 7].

Враховуючи роль гормонів надниркових залоз (глюкокортикоїдів, катехоламінів) у пригніченні вивільнення лізосомальних ферментів і фагоцитарної активності, а також холінергічних агентів, навпаки, в стимулюванні цих процесів, представляло інтерес визначення кількості металів у клітинах з паралельним дослідженням їх концентрації у позаклітинному просторі при дії цих факторів.

Мета нашої роботи – встановити характер розподілу вмісту цинку, магнію та міді в гранулоцитах і сироватці крові кролів при введенні речовин, які змінюють функціональний стан кори надниркових залоз, симпатoadrenalової і парасимпатичної нервової систем.

МЕТОДИКА

У дослідах було використано 45 статевозрілих кролів віком 5-6 міс, масою 2,2 – 2,6 кг. Тварин поділили на 4 групи. I контрольну групу склали 15 інтактних тварин, до II, III і IV дослідних груп увійшло по 10 тварин. Преднізолон вводили кролям внутрішньом'язово в дозі 10 мг/кг у вигляді 1%-го розчину, адреналіну гідрохлорид і пілокарпін – підшкірно в дозах 0,05 і 1 мг/кг у вигляді 0,01 і 0,1%-х розчинів відповідно. Через 0,5-1 год після ін'єкції пілокарпіну, через 2 год після введення адреналіну та преднізолону у тварин брали з вуха кров для біохімічних та цитохімічних досліджень вмісту цинку, магнію та міді. Цитохімічні методи розроблені в умовах нашої лабораторії та захищені патентами на винахід [14-16].

Концентрацію цинку в сироватці крові визначали колориметричним методом без депротейнізації стандартним набором реактивів «SPINREACT» (Іспанія), а вміст магнію та міді – фотометричними методами з використанням стандартних наборів реактивів “Lachema” (Чехія) [17-19].

Мазки крові фіксували протягом 5 хв у висхідних парах формаліну. Потім їх занурювали в суміш для забарвлення, де витримували впродовж 3 год при 70⁰С. Суміш містила 1%-й розчин сульфарсазену, 4%-й розчин ацетату натрію, 25%-й розчин гідроксиду амонію. Після цього препарати промивали протягом 1 хв дистильованою водою та заливали в желатин. Мазки розглядали під світловим мікроскопом. На препаратах кількість цинку визначали в гранулах зернистих лейкоцитів за помаранчевим забарвленням.

Вміст магнію в гранулоцитах крові встановлювали за допомогою магнезонової реакції. Мазки крові, попередньо фіксовані в формаліні, фарбували протягом 12 год у суміші, що складалася з 1%-го розчину магнезону, 10%-го розчину ацетату натрію, 0,25%-вого розчину гідроксиду амонію та дистильованої води. Потім їх промивали дистильованою водою протягом 5 хв. Мазки вивчали під світловим мікроскопом з використанням імерсійної олії. На препаратах у цитоплазмі гранулоцитів виявлялась червона зернистість.

Для визначення вмісту міді в гранулоцитах крові за допомогою реакції дитіооксаміду (ДТО), фіксовані в формаліні мазки фарбували розчином цього реагента (суміш насиченого спиртового розчину рубеанової кислоти, 2%-го розчину ацетату натрію та 25%-го розчину гідроксиду амонію) протягом 3 год при 70⁰С. Потім мазки промивали дистильованою водою впродовж 5 хв, підсушували на повітрі, заливали в гліцерин-желатин і розглядали під світловим мікроскопом. На препаратах у цитоплазмі гранулоцитів виявлялась темно-зелена зернистість.

Інтенсивність цитохімічних реакцій (дитизону, магнезону та ДТО) оцінювали за трибальною системою, запропонованою Соколовським, Хейхоу та Квагліно [20, 21]. За один бал приймали слабопозитивну реакцію, два бали – помірну, три бали – виражену реакцію. На підставі підрахунку на 100 клітинах виводили середнє значення інтенсивності реакції.

Експериментальні результати оброблялися з використанням критерію *t* Стьюдента, що пояснюється нормальним характером розподілу варіант у вибірках (критерій Колмогорова-Смірнова, Statistica 6.0). На всіх етапах експерименту дотримувалися вимог «Загальні етичні принципи експериментів на тваринах».

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Слід відмітити, що після ін'єкції адреналіну вміст цинку достовірно підвищувався в гранулоцитах на 42% і знижувався в сироватці крові на 24%. Подібна картина спостерігалась у разі введення преднізолону. При цьому показники були відповідно на 33% ($P < 0,001$) вище і на 20% ($P < 0,05$) нижче від контролю. Протилежні зміни розвивались під впливом пілокарпіну. Вміст металу зменшувався на 58% ($P < 0,001$) у зернистих лейкоцитах і збільшувався на 28% ($P < 0,01$) у сироватці крові (табл.1).

У тварин, які отримали адреналін, вміст магнію в гранулоцитах крові підвищувався на 50% ($P < 0,001$), а в сироватці знижувався на 33% ($P < 0,01$). Під впливом преднізолону цей показник зростав у зернистих лейкоцитах на 33%, але знижувався в сироватці крові на 22% ($P < 0,01$). Після введення пілокарпіну вміст магнію зменшувався на 33% ($P < 0,001$) у клітинах і збільшувався на 33% ($P < 0,01$) у

сироватці крові (табл.2).

Таким чином, ін'єкції адреналіну та преднізолону викликали накопичення цинку та магнію в гранулоцитах крові за рахунок його втрати сироваткою. У разі введення пілокарпіну вміст металів знижувався в зернистих лейкоцитах і підвищувався в сироватці крові. У всіх випадках встановлена негативна кореляція змін вмісту цинку та магнію в гранулоцитах і сироватці крові.

У тварин під впливом адреналіну зменшувався вміст міді в гранулоцитах крові на 50% ($P < 0,001$) та збільшувався на 43% ($P < 0,05$) у сироватці крові. Після ін'єкції преднізолону встановлено вірогідне зниження цього показника в зернистих лейкоцитах на 25%, підвищення – в сироватці крові на 36%. Призначення пілокарпіну викликало зростання вмісту міді в гранулоцитах на 50% і зменшення в сироватці крові на 43% ($P < 0,001$; табл.3).

Таким чином, під впливом адреналіну та преднізолону зменшувався вміст міді в зернистих лейкоцитах і збільшувався в сироватці крові. Протилежні зміни розвивались після введення пілокарпіну. У всіх випадках встановлена негативна кореляція змін цього показника в гранулоцитах і сироватці крові.

Згідно з літературними даними, важлива роль у розподілі цинку в клітинах і позаклітинному просторі належить металотіонеїнам (MT) – низькомолекулярним

Таблиця 1. Вміст цинку в гранулоцитах і сироватці крові ($M \pm m$) і їх взаємозв'язок (r) при введенні кролям адреналіну, преднізолону, пілокарпіну

Схема дослідження	Гранулоцити, ум.од.	Сироватка, мкмоль/л	r_1
Контроль (n=15)	1,2±0,08	25±1,2	-0,41*
Дослід (n=10)			
адреналін	1,7±0,12***	19±2,3**	-0,43*
преднізолон	1,6±0,10***	20±1,19*	-0,42*
пілокарпін	0,5±0,03***	32±2,4**	-0,41*

Примітка. Тут і в табл.2 і 3: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ порівняно з контролем; r_1 – коефіцієнт кореляції змін вмісту цинку в гранулоцитах і сироватці крові; r_2 – коефіцієнт кореляції змін вмісту магнію в гранулоцитах і сироватці крові; r_3 – коефіцієнт кореляції змін вмісту міді в гранулоцитах і сироватці крові.

Таблиця 2. Вміст магнію в гранулоцитах і сироватці крові ($M \pm m$) і їх взаємозв'язок (r) при введенні кролям адреналіну, преднізолону, пілокарпіну

Схема досліджу	Гранулоцити, ум.од.	Сироватка, ммоль/л	r_2
Контроль (n=15)	0,6±0,04	0,9±0,07	-0,64*
Дослід (n=10)			
адреналін	0,9±0,05***	0,6±0,04**	-0,69**
преднізолон	0,8±0,06**	0,7±0,03*	-0,82***
пілокарпін	0,4±0,02***	1,2±0,08**	-0,48*

цитозольним білкам (близько 6,5 кДа), збагаченим тіоловими групами. Обмін цинку та МТ у клітинах тісно пов'язаний. МТ – головний цинкзв'язуючий білок, а цинк – його фізіологічний індуктор [19, 20]. Крім цинку синтез цього білка індукуює мідь, але перший – активніший, а друга утворює більш стійкі комплекси з МТ [13, 22]. Cu-МТ – форма МТ в організмі, що посідає друге місце після Zn-МТ. МТ зв'язують іони міді, беруть участь разом з церулоплазміном у транспорті, розподілі та реалізації її біологічних ефектів [9, 22, 23]. Подібно до цинку, мідь збільшує антиоксидантну та антитоксичну активність МТ [3, 5, 6, 22, 24]. Відомо, що глюкокортикоїди та інші стресорні гормони індукують експресію та синтез МТ, що викликає зниження концентрації цинку в плазмі крові. Одночасно (в складі церулоплазміну) підвищується вміст міді [22, 23, 25]. Це підтверджується результатами наших експериментів по визначенню вмісту цинку та міді в сироватці крові кролів. Наші попередні дослід-

ження вказують на накопичення цинку та магнію, зниження вмісту міді в гранулоцитах крові тварин інших видів, яким вводили адреналін і преднізолон. Протилежний характер змін металів у клітинах встановлений у разі введення пілокарпіну [26 - 28]. Вважають, що вивільнення цинку з клітини зумовлено розпадом його внутрішньоклітинних лігандів, зокрема МТ [22, 29].

Зіставлення результатів визначення вмісту цинку, магнію та міді в зернистих лейкоцитах і сироватці крові кролів дає змогу стверджувати, що адреналін, преднізолон і пілокарпін викликали протилежні зміни в клітинах крові і позаклітинному просторі, причому між цинком і магнієм спостерігався синергічний характер взаємин, а цими металами та міддю – антагоністичний.

ВИСНОВКИ

Уведення кролям гормонів надниркових залоз (адреналіну, преднізолону), які активують

Таблиця 3. Вміст міді в гранулоцитах і сироватці крові ($M \pm m$) і їх взаємозв'язок (r) при введенні кролям адреналіну, преднізолону, пілокарпіну

Схема досліджу	Гранулоцити, ум.од.	Сироватка, мкмоль/л	r_3
Контроль (n=15)	0,4±0,03	14±1,3	-0,42*
Дослід (n=10)			
адреналін	0,2±0,01***	20±2,4*	-0,41*
преднізолон	0,3±0,02*	19±1,7*	-0,44*
пілокарпін	0,6±0,04***	8±0,5***	-0,47*

стан їх кори та симпатoadреналової системи, викликало накопичення цинку та магнію в гранулоцитах і зниження в сироватці крові.

Призначення пілокарпіну, що пригнічує стан кори надниркових залоз і симпатoadреналової системи й активує парасимпатичну нервову систему, зумовлювало збільшення вмісту цинку та магнію в сироватці крові, а також їх дефіцит у зернистих лейкоцитах.

Кількість міді в гранулоцитах крові кролів зростала після ін'єкції пілокарпіну та знижувалась після введення адреналіну та преднізолону; у сироватці дослідних тварин зміни цього показника мали протилежний характер.

Н.В. Григорова

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИНКА, МАГНИЯ И МЕДИ В ГРАНУЛОЦИТАХ И СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРОЛИКОВ ПРИ ВВЕДЕНИИ ВЕЩЕСТВ, КОТОРЫЕ ИЗМЕНЯЮТ ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ КОРЫ НАДПОЧЕЧНЫХ ЖЕЛЕЗ И АВТОНОМНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

С помощью биохимических и цитохимических методов исследовалось содержание цинка, магния и меди в гранулоцитах и сыворотке крови кроликов, которым вводили вещества, изменяющие функциональное состояние коры надпочечных желез, симпатoadреналовой и парасимпатической нервной систем.

Установлено, что инъекции кроликам адреналина, преднизолон и пилокарпина вызывают разнонаправленные изменения в клетках и внеклеточном пространстве. Наблюдалось достоверное увеличение количества цинка на 33 - 42%, магния – на 33-50%, а также уменьшение меди на 25-50% в гранулоцитах крови животных, которым вводили гормоны надпочечников. Под влиянием холиномиметика в зернистых лейкоцитах кроликов существенно снижалось содержание цинка на 58%, магния – на 33%, а меди – повышалось на 50%. Противоположная картина наблюдалась в сыворотке крови. Назначение адреналина и преднизолон обуславливало достоверное снижение концентрации цинка на 20-24%, магния – 22-30%, а меди – повышение на 36-43%. После инъекции пилокарпина уменьшение содержания цинка и магния составляло 28 и 33 % ($P<0,01$) соответственно, а меди – увеличение на 43% ($P<0,001$). Полученные результаты также указывают на синергические взаимоотношения в клетках цинка и магния, а также антагонистические - этих металлов с медью. Ключевые слова: адреналин, преднизолон, пилокарпин, цинк, магний, медь, гранулоциты, сыворотка крови.

N.V. Grigorova

ALLOCATION OF ZINC, MAGNESIUM AND COPPER IN GRANULOCYTES AND SERUM OF RABBITS WHILE INTRODUCTION OF SUBSTANCES THAT CHANGE THE FUNCTIONAL STATE OF ADRENAL CORTEX AND THE AUTONOMIC NERVOUS SYSTEM

It was investigate the content of zinc, magnesium and copper in granulocytes and blood serum of the rabbits, that were injected with substances, that change the functional state of adrenal cortex, sympathetic-adrenal and parasympathetic nervous systems. It has been found that adrenaline, prednisolone and pilocarpine caused the multidirectional changes of these metals content in cells and in extracellular space. In this significant increase of zinc concentration by 33 - 42%, magnesium – by 33 - 50%, and also decrease of copper content by 25–50% was observed in granulocytes of animals after adrenal hormones injections. Under the influence of cholinomimetics content of zinc and magnesium were essential decreased in granulocytes of the rabbits, by 58% and by 33% respectively, and content of copper was risen by 43% ($P<0,001$).

The opposite pattern was observed in serum. Adrenaline and prednisolone prescription caused a significant decrease of zinc concentration by 20–24%, magnesium – by 22–33%, and increase of copper content by 36-43%. Pilocarpine injection caused a decrease of zinc and magnesium content by 28 and 33 % ($P<0,01$) respectively, and an increase of copper concentration by 43% ($P<0,001$). The obtained results also indicate a synergistic relationship between zinc and magnesium in cells, but antagonistic - these metals with copper.

Key words: adrenaline; prednisolone; pilocarpine; zinc; magnesium; copper; granulocytes; blood serum.

Zaporizhzhya National University

REFERENCES

1. Skalniy AV. Chemical elements in human physiology and ecology. Moscow: Onyx - 21 vek: Mir; 2004. [Russian].
2. Chmylenko FO, Chmylenko TS, Sapa YS, Sayevych OV. Chemical elements and substances in the human body in health and in disease. Dnepropetrovsk: Publishing of Dnepropetrovsk University; 2006. [Ukrainian].
3. Haase H, Maret W. Cellular and molecular Biology of metals. CRC Press. 2010; 10 (5): 181-212.
4. Laires MJ, Monteiro CP, Bicho V. Role cellular magnesium in health and human disease. Front Biosci. 2004; 9: 262-76.
5. Shin SJ, Lee HS, Kwon ST. Molecular characterization of a cDNA encoding copper/zinc superoxide dismutase. Plant Physiol Biochem. 2005; 43(1): 55-60.
6. Tudor R, Zaleski PD, Ratnaik RN. Zinc in health and chronic disease. J Nutr Health Aging. 2005; 9(1): 45-51.
7. Marushko YV, Marushko TV, Grischak TV. The role of magnesium deficiency in pediatric. Sovr pediatriya. 2009;

- 25(3): 41-5. [Ukrainian].
8. Freitas M, Porto G, Lima JL. Zinc activates neutrophils' oxidative burst. *Biometals*. 2010; 23(1): 31-41.
 9. Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. Trace elements in human physiology and pathology. Copper. *Biomed Pharmacother*. 2003; 32(1): 43-54.
 10. Uchida T, Itoh H, Nakamura Y. Zinc and magnesium ions synergistically inhibit superoxide generation by cultured human neutrophils a promising candidate formulation for amnioinfusion fluid. *J Reprod Immunol*. 2010; 85(2): 209-13.
 11. Wellinghausen N, Rink L. The significance of zinc for leukocyte biology. *J Leukoc Biol*. 1998; 64(5): 571-7.
 12. Rink L, Haase H. Zinc homeostasis and immunity. *Trends Immunol*. 2007; 28: 1-4.
 13. Mooren FC, Golf SW, Völker K. Effect of magnesium on granulocyte function and on the exercise induced inflammatory response. *Magnes Res*. 2003; 16(1): 49-58.
 14. Grigорова NV, Eshchenko YV, Bovt VD, Eshchenko VA, inventors; Zaporizhzhya National University, successor of right. Method of magnesium definition in blood granulocytes. Patent 27576 Ukrainian 200706133. 2007 12 november.
 15. Grigорова NV, Eshchenko YV, Bovt VD, Eshchenko VA, inventors; Zaporizhzhya National University, successor of right. Method of copper definition in blood granulocytes. Patent 25158 Ukrainian 200613382. 2007 10 may.
 16. Grigорова NV, Eshchenko YV, Bovt VD, Eshchenko VA, inventors; Zaporizhzhya National University, successor of right. Method of zinc definition in blood granulocytes. Patent 30461 Ukrainian 200712551. 2008 25 february.
 17. Makino T, Saito M, Horiguchi D. Definition of zinc in blood. *Clinica Chimica Acta*. 1982; 120: 127-35.
 18. Menshikov VV, Deliktorskaya LN, Zolotnitskaya RL. Laboratory investigations methods in clinica. Moscow: Medicina; 1983. [Russian].
 19. Thomas T. Clinical laboratory diagnosis. Frankfurt: Verlagsgesellschaft; 1998.
 20. Sokolovskiy VV. Histochemical investigations in toxicology. Leningrad: Medicina; 1971. [Russian].
 21. Hayhoe F, Quaglino D. Haematological cytochemistry. Moscow: Medicina; 1983. [Russian].
 22. Baraboy VA, Petrina LG. Metallothioneins: structure and action mechanisms. *Ukr Biochem J*. 2003; 5(4): 28-35. [Ukrainian].
 23. Maret W. Fluorescent probes for the structure and function of metallothionein. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2009; 877(28): 3378-83.
 24. Maret W. Metallothionein redox biology in the cytoprotective and cytotoxic functions of zinc. *Exp Gerontol*. 2008; 43: 363-9.
 25. Barashkov GK, Zaitzeva LI, Kondahchan MA, Konstantinova EA. Distribution of chemical elements in whole blood and plasma. *Biomed Chemistry*. 2011; 3(2): 9-14. [Ukrainian].
 26. Grigорова NV, Eshchenko YV, Karpov AK. Zinc content in blood granulocytes and B-insulocytes people and animals, other species under adrenaline, prednisolone and pilocarpine introduction. *Visnik Zaporizh Nat Univer. Biolog Science*. 2009; 1: 89-92. [Ukrainian].
 27. Eshchenko VA, Grigорова NV, Nizhnyak EA. Zinc and magnesium in neutrophils animals during the action of adrenaline, prednisolone and pilocarpine. *Vital Question Biol, Ecol and Chemist*. 2011; 3(2): 9-14. [Ukrainian].
 28. Grigорова NV. Comparative investigations contents of copper in blood granulocytes and zinc in B-insulocytes. The Materials IV Intern Scientific Praktic Conference "Dinamic of Investigations". 2008; 22: 71-2. [Ukrainian].
 29. Zorin SN. Experimental characteristic by essential microelements of organic complexes (zinc and selen). *Microelem in Med*. 2008; 9(1, 2): 16-7. [Russian].

*Матеріал надійшов
до редакції 04.09.2014*