

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

СОДЕРЖАНИЕ ЦИНКА И МЕДИ В ГРАНУЛОЦИТАХ КРОВИ У ЛИЦ С ИММУНОДЕФИЦИТОМ

ZINC AND COPPER CONTENT IN BLOOD GRANULOCYTES OF PERSONS WITH IMMUNODEFICIENCY

Н.В. Григорова*, Ю.В. Ещенко, В.Д. Бовт, В.А. Ещенко
N.V. Grigорова*, J.V. Eshchenko, V.D. Bovt, V.A. Eshchenko

Запорожский национальный университет, Запорожье, Украина
Zaporizhzhya National University, Zaporizhzhya, Ukraine

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гранулоциты, иммунодефицит, мазки крови, медь, цинк

KEYWORDS: blood smears, cooper, granulocytes, immunodeficiency, zinc

РЕЗЮМЕ: С помощью разработанных цитохимических методов исследовалось содержание цинка и меди в гранулоцитах крови у людей с иммунодефицитами разного происхождения. Для определения цинка применяли дитизон и 8-(*p*-толуолсульфониламино)-хинолин. Медь выявляли с помощью дитиооксамида и люмокупферона. Окрашенные мазки рассматривали с помощью световой и люминесцентной микроскопии (светофильтры ФС-1 и ЖС-18). Иммунодефицит при сахарном диабете, ВИЧ-инфекции и стрессах сопровождался снижением содержания цинка и увеличением количества меди в клетках. Показана зависимость между изменениями содержания этих металлов в гранулоцитах крови и тяжестью иммунодефицита.

SUMMARY: Zinc and cooper content in human blood granulocytes was investigated under immunodeficiency of various origin with the aid of elaborated cytochemical methods. Dithizone and 8-(*p*-toluenesulfonylamino)-quinoline were used for zinc determination. Copper was revealed with dithiooxamide and lumocupferon. Stained smears were visualized by means of light and luminescent microscopy (light filters V-1 and Y-18). Immunodeficiency under diabetes mellitus, HIV- infection and stresses was accompanied by zinc content decrease and copper quantity increase in the cells. A dependence was shown between these metals content changes in blood granulocytes and immunodeficiency severity.

Цинк и медь являются жизненно важными элементами для клеток (Ещенко, 1978; Браун и др., 1987;

Авцын и др., 1991; Скальный, 2004). Они необходимы для активности многих металлоферментов (Vallee, 1988; Linghua et al., 2005; Wang et al., 2005; Webby et al., 2005), оказывают влияние на проницаемость клеточных мембран (Bray et al., 1990; Pelmschikov et al., 2005). При сахарном диабете, ВИЧ-инфекции и стрессе нарушается активность ферментов и проницаемость биомембран (Панин, 1983; Wellinghausen, 2000). Такие заболевания и состояния сопровождаются иммунодефицитами, при которых биохимическими методами выявлены нарушения обмена меди и цинка в организме (Heen et al., 1990; Turnham, 1997). Отсутствие совершенных методов цитохимического определения данных металлов не позволяло провести такие же исследования на клеточном уровне. Нами были разработаны новые, современные методы определения цинка и меди в клетках, которые и были использованы в настоящем исследовании. Цинк определяли с помощью цитохимических реакций дитизона и 8-(*p*-толуолсульфониламино)-хинолина (8-ТСХ), медь – с помощью реакций дитиооксамида (ДТО) и люмокупферона (ЛК) (Ещенко, 1978).

Методика исследования

Было обследовано 69 человек, в том числе контрольные (здоровые) лица, больные сахарным диабетом и ВИЧ-инфекцией, а также лица, подвергавшиеся стрессовым воздействиям (физическая нагрузка и др.).

Иммунный статус обследованных лиц выявляли по характеристикам специфического (клеточного и гуморального), а также неспецифического иммунитета. Функциональное состояние клеточного звена иммунитета определяли по показателям количества Т- и В-лимфоцитов и их субпопуляционного состава методом розеткообразования. У обследованных лиц для выяснения гуморального иммунитета использовали показатели уровня иммуноглобулинов G, A,

* Адрес для переписки:

Григорова Н.В.
Украина, 69600, г. Запорожье, ул. Жуковского, 66,
Запорожский национальный университет;
e-mail: camelot@io.net.ua

М по Манчини и циркулирующих иммунных комплексов по Дижону, а также титра гетерофильных антител. О состоянии факторов неспецифической резистентности организма свидетельствовали данные исследований титра комплемента по 50 % гемолизу, фагоцитарной активности и показателей теста восстановления нитросинего тетразолия. Использование этих методов позволяло не только диагностировать иммунодефицит, но и оценивать его степень выраженности (тяжелый, средней тяжести, легкий).

Для цитохимического выявления микроэлементов с помощью указанных металлохромных реагентов использовали мазки крови, взятой из пальца. Мазки фиксировали высушиванием в течение 2 ч на воздухе, либо фиксацией в течение 5 мин в парах формалина. Затем мазки выдерживали продолжительностью в 2-3 ч в водно-аммиачных растворах дитизона и ДТО. После промывки в дистиллированной воде мазки заключали в желатин и рассматривали под световым микроскопом. При окраске дитизоном в цитоплазме зернистых лейкоцитов выявляли красные, а при окраске ДТО – темно-зеленые гранулы.

Цитохимические реакции 8-ТСХ и ЛК получали флуорохромированием мазков ацетоновыми растворами этих реагентов. Для возбуждения люминесценции применяли светофильтр ФС-1, в качестве защитного (окулярного) использовали светофильтр из стекла ЖС-18. 8-ТСХ и ЛК давали желто-зеленое свечение цитоплазмы гранулоцитов крови.

Интенсивность цитохимических реакций оценивали по трехбалльной системе, предложенной Соколовским В.В. (1971), а также Хейхоу Ф. и Кваглино Д. (1983). Среднюю величину высчитывали на основании определений в 100 клетках. Подсчитывали ошибку (m) и показатель достоверность (p).

Результаты исследования

В таблице 1 представлены данные определений цинка и меди в гранулоцитах крови у людей при сахарном диабете, ВИЧ-инфекции, стрессе.

Как видно из таблицы, у контрольных (здоровых)

лиц интенсивность цитохимической реакции дитизона составляла $1,3 \pm 0,11$, 8-ТСХ – $1,4 \pm 0,10$, ДТО – $0,5 \pm 0,03$, ЛК – $0,7 \pm 0,05$. Реакция дитизона была снижена на 30% ($p < 0,01$) при диабете, 23% ($p < 0,05$) – при ВИЧ-инфекции, 38% ($p < 0,001$) – при стрессе. В случае с 8-ТСХ-реакцией получены данные соответственно 36% ($p < 0,001$), 29% ($p < 0,01$), 36% ($p < 0,001$). При постановке ДТО – реакции интенсивность ее была повышена на 40% ($p < 0,001$) у лиц с диабетом, 60% ($p < 0,001$) – ВИЧ-инфекцией, 60% ($p < 0,001$) – стрессом. Данные исследований ЛК-реакции составляли соответственно 71% ($p < 0,001$), 43% ($p < 0,001$), 57% ($p < 0,001$).

Таким образом, при сахарном диабете, ВИЧ-инфекции, стрессе наблюдалось снижение содержания цинка и увеличение количества меди в зернистых лейкоцитах

Данные определения металлов в гранулоцитах крови при иммунодефицитах разной тяжести приведены в таблице 2.

Интенсивность цитохимической реакции дитизона была снижена на 54% ($p < 0,001$) при тяжелом иммунодефиците, 38% ($p < 0,001$) – средней тяжести, 23% ($p < 0,05$) – легком. При окраске 8-ТСХ получались результаты соответственно 50% ($p < 0,001$), 43% ($p < 0,001$), 21% ($p < 0,05$). Интенсивность реакции ДТО была повышена на 100% ($p < 0,001$) при тяжелом, 80% ($p < 0,001$) – средней тяжести, 40% ($p < 0,001$) – легком иммунодефиците. В случае использования ЛК получались данные соответственно 100% ($p < 0,001$), 57% ($p < 0,001$), 29% ($p < 0,01$).

Таким образом, результаты исследований указывают на то, что содержание цинка и меди в зернистых лейкоцитах гранулоцитах крови изменяется соответственно тяжести иммунодефицита. По-видимому, некоторые соединения цинка и связывающие медь вещества могут служить иммунотерапевтическими средствами.

Литература

Авцын А.П., Жаворонков А.К., Риш М.А., Строчкова Л.С.

Таблица 1. Интенсивность цитохимических реакций на цинк дитизона и 8-(*n*-толуолсульфониламино)-хинолина (8-ТСХ), а также на медь дитиооксамида (ДТО) и люмокупферона (ЛК) в гранулоцитах крови у лиц, страдающих сахарным диабетом, ВИЧ-инфекцией, а также лиц, подвергавшихся стрессовым воздействиям ($X \pm m$)

Группа обследованных лиц	Интенсивность реакции, у.е.			
	дитизон	8-ТСХ	ДТО	ЛК
Контроль (n = 19)	$1,3 \pm 0,11$	$1,4 \pm 0,10$	$0,5 \pm 0,03$	$0,7 \pm 0,05$
Сахарный диабет (n = 12)	$0,9 \pm 0,06^{**}$	$0,9 \pm 0,09^{***}$	$0,7 \pm 0,04^{***}$	$1,2 \pm 0,09^{***}$
ВИЧ-инфекция (n = 10)	$1,0 \pm 0,07^*$	$1,0 \pm 0,08^{**}$	$0,8 \pm 0,08^{***}$	$1,0 \pm 0,07^{***}$
Стресс (n = 28)	$0,8 \pm 0,05^{***}$	$0,9 \pm 0,07^{***}$	$0,8 \pm 0,07^{***}$	$1,1 \pm 0,08^{***}$

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$

Таблица 2. Интенсивность цитохимических реакций на цинк дитизона и 8-ТСХ, на медь ДТО и ЛК в гранулоцитах крови у лиц с иммунодефицитами разной тяжести ($\bar{X} \pm m$)

Тяжесть иммунодефицита	Интенсивность реакции, у.е.			
	дитизон	8-ТСХ	ДТО	ЛК
Контроль (n = 19)	1,3 ± 0,11	1,4 ± 0,10	0,5 ± 0,03	0,7 ± 0,05
Тяжелый (n = 10)	0,6 ± 0,03***	0,7 ± 0,05***	1,0 ± 0,07***	1,4 ± 0,11***
Средней тяжести (n = 12)	0,8 ± 0,05***	0,8 ± 0,06***	0,9 ± 0,08***	1,0 ± 0,09***
Легкий (n = 15)	1,0 ± 0,06*	1,1 ± 0,08*	0,7 ± 0,04***	0,9 ± 0,07**

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$

- Микроэлементозы человека. М.: Медицина. 1991, 496с.
- Браун А.Д., Моженок Т.П. Неспецифический адаптационный синдром клеточной системы. Л.: Наука. 1987, 232с.
- Бутенко З.А., Глузман Д.Ф., Зак П.Н., Филатова Р.С., Шляховенко В.А. Цитохимия и электронная микроскопия клеток крови и кровяных органов. Киев: Наукова думка. 1974, 247с.
- Ещенко В.А. Гистохимическое исследование цинка // Цитология. Т.20. №8. 1978, С. 927-933.
- Кудрин А.В., Скальный А.В., Жаворонков А.Е., Скальная М.Г., Громова О.А. Иммунофармакология микроэлементов. М.: изд-во КМК. 2000, 537с.
- Панин Л.Е. Биохимические механизмы стресса. Новосибирск: Наука. 1983, 233с.
- Скальный А.В. Биоэлементы в медицине. М.: Медицина. 2004, 272с.
- Соколовский В.В. Гистохимические исследования в токсикологии. Л.: Медицина. 1971, 172с.
- Хейхоу Ф.Г.Дж., Кваглино Д. Гематологическая цитохимия. М.: Медицина. 1983, 320с.
- Bray T.M., Bettger W.J. The physiological role of zinc as an antioxidant // Free Radic. Biol. Med. 1990. Vol.8. P. 281 – 291.
- Keen C.L., Gershwin M.C. Zinc deficiency and immune function // Ann. Rev. Nutr. 1990. Vol.10. P.415 – 431.
- Lianghua T., Liming X. Purification and partial characterization of a lipase from *Bacillus coagulans* ZIU 318 // Appl. Biochem. Biotechnol. 2005. Vol.125. №2. P.139-146.
- Pelmenschikov V., Sieghahn P.E. Copper-zinc superoxide dismutase: theoretical insights on the catalytic mechanism // Inorg. Chem. 2005. Vol.44. №9. P.3311-3320.
- Thurnham D.J. Micronutrients and immune function: some recent developments // J. Clin. Pathol. 2005. Vol.50. P.887–891.
- Vallee B.L. Zinc: biochemistry, physiology, toxicology and clinical pathology // Biofactors. 1988. Vol.1. №1. P.31–36.
- Wang S.H., Zhi Q.W., Sun M.J. Purification and characterization of recombinant human liver prolidase expressed in *Saccharomyces cerevisiae* // Arch. Toxicol. 2005. Vol.79. №5. P.5647–5659.
- Webby C.J., Patchett M.L., Parker E.J. Characterization of a recombinant type II 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase from *Helicobacter pylori* // Biochem. J. 2005. Vol.390. Pt1. P.223–230.
- Wellinghausen N. Zinc serum level in human immunodeficiency virus-infected patients in relation to immunological status // Biol. Trace Elem. Res. 2000. Vol.73. №2. P.139–149.

