

## ВМІСТ МАГНІЮ В ПАНКРЕАТИЧНИХ ОСТРІВЦЯХ, ТИМУСІ ТА ЛІМФОЦИТАХ КРОВІ ТВАРИН В УМОВАХ МОДЕЛЮВАННЯ ДІАБЕТУ ТА СТРЕСУ

Григорова Н.В.

Запорізький національний університет  
вул. Жуковського, 66, 69600, м. Запоріжжя  
nvgrigorova@ukr.net

У досліджах на мишах і щурах із цукровим діабетом вивчався вплив стресу на вміст магнію – макроелементу, що підвищує захисні властивості організму, в лімфоцитах крові, клітинах підшлункової і вилочкової залоз тварин. Експериментальний діабет у тварин викликали підшкірним введенням алоксану, а для моделювання стресу робили ін'єкції адреналіну та преднізолону. Для цитохімічного виявлення магнію в панкреатичних клітинах  $\beta$ , тимусних епітеліальних клітинах (ТЕК) і лімфоцитах крові дослідних тварин використовували методи, розроблені в нашій лабораторії. Встановлено накопичення магнію у  $\beta$ -клітинах панкреатичних острівців, клітинах тимуса та лімфоцитах крові при введенні мишам і щурам адреналіну та преднізолону, підвищення рівня яких у крові супроводжує розвиток гострої стресової реакції, що характеризується активацією симпатичного відділу нервової системи і функції надниркових залоз. Після ін'єкцій гормонів надниркових залоз з алоксановим діабетом спостерігалася часткова корекція дефіциту магнію в досліджених клітинах. Позитивна кореляція змін кількості металу в досліджених клітинах тварин вказує на наявність тісних імунно-інсулярних взаємин. *Ключові слова:* цукровий діабет, стрес, магній, панкреатичні острівці, тимус, лімфоцити крові.

**Содержание магния в панкреатических островках, тимусе и лимфоцитах крови животных в условиях моделирования диабета и стресса. Григорова Н.В.** В опытах на мышах и крысах с сахарным диабетом изучалось влияние стресса на содержание магния – макроэлемента, что повышает защитные свойства организма, в лимфоцитах крови, клетках поджелудочной и вилочковой желез животных. Экспериментальный диабет у животных вызывали подкожным введением алоксана, а для моделирования стресса делали инъекции адреналина и преднизолон. Для цитохимического выявления магния в панкреатических клетках  $\beta$ , тимусных эпителиальных клетках (ТЭК) и лимфоцитах крови подопытных животных использовали методы, разработанные в нашей лаборатории. Установлено накопление магния в  $\beta$ -клетках панкреатических островков, клетках тимуса и лимфоцитах крови при введении мышам и крысам адреналина и преднизолон, повышение уровня которых в крови сопровождается развитием острой стрессовой реакции, характеризуется активацией симпатического отдела нервной системы и функции надпочечников. После инъекций гормонов надпочечников с алоксановым диабетом наблюдалась частичная коррекция дефицита магния в исследованных клетках. Положительная корреляция изменений количества металла в исследованных клетках животных указывает на наличие тесных иммунно-инсулярных взаимоотношений. *Ключевые слова:* сахарный диабет, стресс, магний, панкреатические островки, тимус, лимфоциты крови.

**Magnesium content in pancreatic islets, thymus and blood lymphocytes in animals under conditions of diabetes and stress modeling. Hryhorova N.V.** In experiments on mice and rats with diabetes, stress was studied on the content of magnesium – a macro element that increases the body's protective properties, blood lymphocytes, cells of the pancreas and thymus glands of animals. Experimental diabetes in animals was induced by subcutaneous administration of aloxane, and for stress modeling, they injected adrenaline and prednisolone. For cytochemical detection of magnesium in pancreatic  $\beta$  cells, thymic epithelial cells (TEC) and blood lymphocytes of experimental animals, methods developed in our laboratory were used. The accumulation of magnesium in the  $\beta$ -cells of pancreatic islets, thymus cells and blood lymphocytes is established when adrenaline and prednisolone are administered to mice and rats whose elevation in the blood accompanies the development of acute stress reaction characterized by activation of the sympathetic part of the nervous system and adrenal function. After injections of adrenal hormones with aloxane diabetes, partial correction of magnesium deficiency in the studied cells was observed. The positive correlation of changes in the amount of metal in the studied cells of animals indicates the existence of close immune-insular relationships. *Key words:* diabetes mellitus, stress, magnesium, pancreatic islets, thymus, blood lymphocytes.

**Постановка проблеми.** Цукровий діабет (далі – ЦД) являє собою постійно та швидко зростаючу медико-соціальну проблему в усіх індустріально розвинених країнах. Поширеність ЦД у світі перевищує всі теоретичні прогнози та має характер неінфекційної пандемії. Якщо 15 років тому експерти ВООЗ припускали, що до 2025 р. число хворих на ЦД в світі становитиме 380 млн осіб, то, за даними Міжнародної асоціації діабету, в 2011 р. кількість хворих на ЦД вже досягла 366 млн, а, за прогнозами

експертів ВООЗ, до 2030 р. число таких осіб становитиме 552 млн осіб [1; 2]. За останнє десятиріччя кількість хворих на діабет в Україні стрімко зростає з 1,8 до 2,8%. Однак, як свідчать дослідження, їх реальна кількість щонайменше вдвічі більша, оскільки половина хворих навіть не здогадується про свою недугу. Нині в Україні від ЦД страждає 1,2 млн осіб [3; 4].

Організм хворого на ЦД у реальному житті зазнає впливу стресогенних факторів, у тому числі еколо-

гічно несприятливих, що може відбутися на перебігу захворювання. Відомо, що при стресі змінюється, зокрема, функціональний стан кори надниркових залоз і автономної нервової системи [5; 6]. Тому введення лабораторним тваринам з алоксановим діабетом адреналіну та преднізолону дексаметазону дасть змогу змодельовати при стресовій ситуації зазначені зміни стану гормональної та нервової систем.

**Актуальність дослідження.** Відомо, що в основі ЦД лежать глибокі порушення обміну речовин, у тому числі мінерального [4–6]. На особливу увагу, на наш погляд, заслуговують дослідження вмісту внутрішньоклітинного магнію, що належить до найбільш важливих і незамінних для життєдіяльності живого організму макроелементів. Він відіграє важливу роль у функціонуванні різних органів, у тому числі підшлункової залози [7]. Іони магнію, як відомо, є антагоністами іонів кальцію, що активують у клітинах панкреатичних островців мікротубулярно-мікрофіламентну систему, відповідальну за транспорт і екзоцитоз секреторних гранул [4; 7]. Метал, з'єднуючись з інсуліном, переводить гормон в активний стан. Баланс магнію модулює трансмембранний потік глюкози в м'язи, гепатоцити, нейрони, клітини плаценти та інші енерговмісні, насичені мітохондріями клітини організму, перешкоджаючи тим самим формуванню інсулінорезистентності [7; 8]. Магній зміцнює й імунну систему. При недостатності металу розвивається прискорена інволюція тимуса, зменшується активність В- і Т-клітин [7–9]. Практично у всіх хворих на діабет виявляється гіпомагніємія [7]. Аналогічні зміни концентрації магнію в крові спостерігаються у тварин при розвитку експериментального ЦД [8]. Відомо, що клітинні механізми автоімунної агресії є головною причиною деструкції  $\beta$ -клітин панкреатичних островців у процесі інсулінозалежного діабету [10]. Враховуючи той факт, що в автоімунній реакції клітинного ланцюга імунітету беруть участь лімфоцити та тимус – центральний орган імуногенезу [11; 12], становлять інтерес порівняльні дослідження вмісту магнію в панкреатичних островцях, тимусних епітеліальних клітинах (ТЕК) і лімфоцитах крові тварин з алоксановим діабетом під впливом гормонів надниркових залоз. Раніше такі дослідження не проводилось через брак досконалих методів цитохімічного виявлення магнію. Розробка в нашій лабораторії методів визначення цього металу в клітинах підшлункової і виличкової залоз, а також лімфоцитах крові, дала змогу провести такі дослідження.

Загальнонаукове значення роботи полягає в розширенні уявлень про механізми розвитку ЦД та стресу.

**Мета** дослідження – вивчити зміни вмісту магнію в панкреатичних островцях, тимусі та лімфоцитах крові тварин з алоксановим діабетом в умовах моделювання стресової ситуації.

### Методологічне або загальнонаукове значення.

У досліджах були використані білі статевозрілі миші та щурі віком 5–6 місяців, по 60 особин кожного виду. У всіх експериментах інтактні тварини слугували контролем, тому що після дослідження контрольної групи тварин (тварини, яким вводили фізіологічний розчин) та інтактною групи (тварини без втручань) були отримані дані, які між собою статистично не відрізнялися. Дослідження з використанням лабораторних тварин проводились згідно з вимогами ст. 26 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження», «Європейської конвенції про захист хребетних тварин» (Страсбург, 1986) та принципів біоетики.

Діабет у тварин викликали шляхом підшкірного введення алоксану в дозі 200 мг/кг. В окремій серії експериментів тваринам з алоксановим діабетом та без нього вводили підшкірно адреналіну гідрохлорид у дозі 0,05 мг/кг і преднізолон – внутрішньом'язово в дозі 10 мг/кг ваги тіла. Першу ін'єкцію речовин робили через добу після введення алоксану, наступні – щоденно впродовж 4 діб. У тварин через 5 діб після введення діабетогенної речовини, 5 діб та ще 2 год пізніше – алоксану та гормонів надниркових залоз прижиттєво брали кров із хвоста, а після забою методом декапітації – шматочки підшлункової та виличкової залоз.

Для виявлення магнію в лімфоцитах крові на предметне скло наносили шар яєчного білка, готували мазки, підсушували на повітрі, промивали дистильованою водою. Забарвлювали мазки 0,05% спиртовим розчином люмомагнезону. Промивання забарвлених мазків проводили 0,1n розчином гідроксиду натрію і підсушували на повітрі. На мазок наносили краплю імерсійної олії і розглядали його під люмінесцентним мікроскопом. Для збудження люмінесценції використовували світлофільтр ФС-1, а як захисний (окулярний) – світлофільтр ЖС-18.

Для цитохімічного визначення магнію в клітинах підшлункової і виличкової залоз шматочки цих органів фіксували в 70° холодному (4°С) спирті, насиченому сірководнем. Потім шматочки проводили через спирти зростаючої міцності (80°, 90°, 96°, 100° – по 4 год. у кожному), суміш 50%-го ксилолу та 50%-го парафіну (по 30 хв. при температурі 40°С), два ксилоли (по 15 хв. у кожному), суміш 50%-го ксилолу та 50%-го парафіну (по 30 хв. при температурі 40°С), два рідкі парафіни (по 1,5 год. у кожному при 50°С) та заливали у парафін.

Парафінові зрізи 5 мкм завтовшки обробляли впродовж 3 хв. послідовно у двох ксилолах і спиртах. Потім флуорохромували 1% водним розчином люмомагнезом впродовж 3 год. і вивчали під люмінесцентним мікроскопом із використанням масляної імерсії (світлофільтри ФС-1 і ЖС-18). Оцінку інтенсивності рожевого забарвлення цитоплазми лімфоцитів, інсулоцитів і ТЕК проводили за допомогою мікрофлуориметра. Інтенсивність флуорес-

ценції виражали в умовних одиницях (ум. од.). Експериментальні дані обробляли за допомогою критерію t Стьюдента, що пояснюється нормальним характером розподілу варіант у вибірках (критерій Колмогорова-Смірнова, Statistica, 6.0). Обчислювали коефіцієнт кореляції Пірсона (r) для оцінки ступеня зв'язку між змінами досліджених показників.

**Виклад основного матеріалу.** Було встановлено, що введення мишам діабетогенного агенту алоксану призводило до зниження вмісту магнію на 54% у панкреатичних клітинах  $\beta$  і лімфоцитах крові, 63% – ТЕК (P<0,001). У тварин, які отримали адреналін, вміст металу збільшувався на 36% у  $\beta$ -клітинах острівців (P< 0,05), 49% – клітинах тимуса (P<0,01) і 34% (P<0,05) – у лімфоцитах крові (таблиця 1).

Аналогічні зміни вмісту магнію спостерігалися у мишей після ін'єкції преднізолону: збільшення показника в досліджених клітинах становило відповідно 27% (P<0,05), 37% (P<0,01) і 26% (P<0,05). Після введення адреналіну мишам з алоксановим діабетом вміст магнію порівняно з контролем був нижчим на 37% у панкреатичних острівцях і тимусі (P<0,001), 34% (P<0,01) – лімфоцитах крові. Порівняно з діабетичними тваринами вміст дослідженого металу в клітинах був вище на 38% (P<0,05), 68 і 43% (P<0,01) відповідно. У разі призначення преднізолону мишам із діабетом вміст магнію порівняно з контролем був високо достовірно нижчим на 36% в острівцевих  $\beta$ -клітинах, 51% – клі-

тинах вилочкової залози, 40% – лімфоцитах крові. У порівнянні з тваринами, що отримували алоксан, показники збільшувалися на 19% (P<0,05), 32 і 29% (P<0,01) відповідно. Достовірні коефіцієнти кореляції змін вмісту магнію в інсулоцитах, ТЕК і лімфоцитах крові дослідних мишей свідчать на користь існування функціонального зв'язку між цими клітинами.

Подібний характер змін вмісту магнію в панкреатичних острівцях, тимусі та лімфоцитах крові спостерігався в досліді на щурах із діабетом, яким вводили гормони надниркових залоз (таблиця 2).

Вміст магнію в інсулоцитах, ТЕК і лімфоцитах крові знижувався після ін'єкції алоксану на 54, 49 і 50% (P<0,001), підвищувався після введення адреналіну на 39%, 30% (P< 0,001) і 32% (P<0,05), преднізолону – на 23, 20 і 26% (P<0,05). Після введення адреналіну щурам з алоксановим діабетом вміст магнію порівняно з контролем був нижче на 23% (P<0,05) у панкреатичних острівцях, 30% (P<0,001) – тимусі, 31% (P<0,001) – лімфоцитах крові. У порівнянні з діабетичними тваринами вміст дослідженого металу в клітинах був вище відповідно на 66, 38 і 37% (P<0,001). У разі призначення преднізолону щурам із діабетом вміст магнію порівняно з контролем був достовірно нижчим на 29% (P<0,01) в острівцевих  $\beta$ -клітинах, 40% (P<0,001) – клітинах вилочкової залози, 38% (P<0,01) – лімфоцитах крові. У порівнянні з тваринами, що отримували алоксан, показники збільшувалися на 50% (P<0,001), 19 і 24%

Таблиця 1

**Вміст магнію (M $\pm$ m) в інсулоцитах, ТЕК, лімфоцитах крові та їх взаємозв'язок (r) у мишей при введенні алоксану, адреналіну, преднізолону, n=10**

Група тварин	Вміст магнію, ум. од.			r <sub>1</sub>	r <sub>2</sub>
	Інсулоцити	ТЕК	Лімфоцити крові		
Контроль	92 $\pm$ 6,7	67 $\pm$ 5,0	125 $\pm$ 10,8	0,65*	0,57*
Алоксан	42 $\pm$ 2,5***	25 $\pm$ 1,7***	58 $\pm$ 3,3***	0,82***	0,84***
Адреналін	125 $\pm$ 10,0*	100 $\pm$ 8,3**	167 $\pm$ 14,2*	0,75**	0,59*
Преднізолон	117 $\pm$ 8,3*	92 $\pm$ 6,7**	158 $\pm$ 10,8*	0,73***	0,60*
Алоксан + адреналін	58 $\pm$ 2,5***, #	42 $\pm$ 2,5***, ###	83 $\pm$ 5,8**, ###	0,83***	0,62*
Алоксан + преднізолон	50 $\pm$ 3,3***, #	33 $\pm$ 1,7***, ###	75 $\pm$ 4,2***, ###	0,86***	0,74**

Примітка: тут і далі: \* – p < 0,05; \*\* – p < 0,01; \*\*\* – p < 0,001 порівняно з контролем; # – p < 0,05; ## – p < 0,01; ### – p < 0,001 порівняно з тваринами, яким вводили алоксан; r<sub>1</sub> – коефіцієнт кореляції змін вмісту магнію в інсулоцитах і ТЕК; r<sub>2</sub> – коефіцієнт кореляції змін вмісту магнію в інсулоцитах і лімфоцитах крові.

Таблиця 2

**Вміст магнію (M $\pm$ m) в інсулоцитах, ТЕК, лімфоцитах крові та їх взаємозв'язок (r) у щурів при введенні алоксану, адреналіну, преднізолону, n=10**

Група тварин	Вміст магнію, ум. од.			r <sub>1</sub>	r <sub>2</sub>
	Інсулоцити	ТЕК	Лімфоцити крові		
Контроль	108 $\pm$ 7,5	83 $\pm$ 5,8	133 $\pm$ 12,5	0,75**	0,76***
Алоксан	50 $\pm$ 3,3***	42 $\pm$ 1,7***	67 $\pm$ 5,0***	0,85***	0,73**
Адреналін	150 $\pm$ 8,3***	108 $\pm$ 7,5***	175 $\pm$ 15,0*	0,52*	0,75**
Преднізолон	133 $\pm$ 10,0*	100 $\pm$ 5,0*	167 $\pm$ 11,7*	0,65*	0,64*
Алоксан + адреналін	83 $\pm$ 5,8*, ###	58 $\pm$ 3,3***, ###	92 $\pm$ 6,7**, ###	0,73**	0,86***
Алоксан + преднізолон	75 $\pm$ 5,0**, ###	50 $\pm$ 2,5***, #	83 $\pm$ 5,0**, #	0,75**	0,87***

( $P < 0,05$ ) відповідно. У всіх випадках встановлена позитивна кореляція змін вмісту магнію в досліджених клітинах підшлункової і вилочкової залоз, а також крові.

**Головні висновки.** Встановлено накопичення магнію у  $\beta$ -клітинах панкреатичних острівців, клітинах тимуса та лімфоцитах крові при введенні мишам і щурам адреналіну та преднізолону, підвищення рівня яких у крові супроводжує розвиток гострої стресової реакції, що характеризується активацією

симпатичного відділу нервової системи і функції надниркових залоз. Після ін'єкцій гормонів надниркових залоз з алоксановим діабетом спостерігалася часткова корекція дефіциту магнію в досліджених клітинах. Позитивна кореляція змін кількості металу в досліджених клітинах тварин вказує на наявність тісних імунно-інсулярних взаємин.

Перспективи використання дослідження базуються на можливості проведення заходів патогенетичного лікування ЦД на тлі розвитку стресу.

### Література

1. Sundararaghavan V., Mazur M.M., Evans B. Diabetes and bone health: latest evidence and clinical implications. *Ther. Adv. Musculoskelet Dis.* 2017. Vol. 9, № 3. P. 67–74.
2. Ingelfinger J.R., Jarcho J.A. Increase in the Incidence of Diabetes and Its Implications. *N. Engl. J. Med.* 2017. Vol. 376, № 15. P. 1473–1474.
3. Паньків В.І. Цукровий діабет: визначення, класифікація, епідеміологія, фактори ризику. *Международный эндокринологический журнал.* 2013. Т. 55, № 7. С. 95–104.
4. Боднар П.М., Михальченко Г.П., Комісаренко Ю.І. *Ендокринологія.* Вінниця: Нова книга, 2013. 480 с.
5. Демичева О.Ю. *Сахарный диабет.* Москва: Эксмо, 2016. 160 с.
6. Гарднер Д., Шибек Д. *Базисная и клиническая эндокринология.* Москва: Бином, 2016. 464 с.
7. De Baaij J.H., Hoenderop J.G., Bindels R.J. Magnesium in man: implication for health and disease. *Physiol. Rev.* 2015. Vol. 95. P. 1–46.
8. Haase H., Maret W. *Cellular and molecular Biology of metals.* CRC Press. 2010. Vol. 10, № 5. P. 181–212.
9. Tam M., Gomez S., Gonzales-Gross M. Possible roles of magnesium on the immune system. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2003. Vol. 57, № 10. P. 1193–1197.
10. Lernmark A., Le Torre D. Immunology of  $\beta$ -cell destruction. *Islets of Langergans.* 2015. P. 1047–1080.
11. Geenene V., Brilot F., Lonis C. Importance of a thymus dysfunction in the pathophysiology of type 1 diabetes. *Kev. Med. Liege.* 2005. Vol. 60, № 5–6. P. 291–296.
12. Diana J., Gahzarian L., Simoni J. Innate immunity in type 1 diabetes. *Discov. Med.* 2011. Vol. 61. P. 513–520.