

содержания частиц с конечной энергией разного значения и с равной вероятностью взаимного постоянства за счёт встречных реакций. На это указывает установленные авторами равенства в энергетическом отношении величин энергии активации в рамках модели Аррениуса по вязкому течению расплавов и в рамках парциально-кластерной модели на основе воздействия энергии хаотизации тех же сплавов (рис. 2).

E_v , Дж/моль

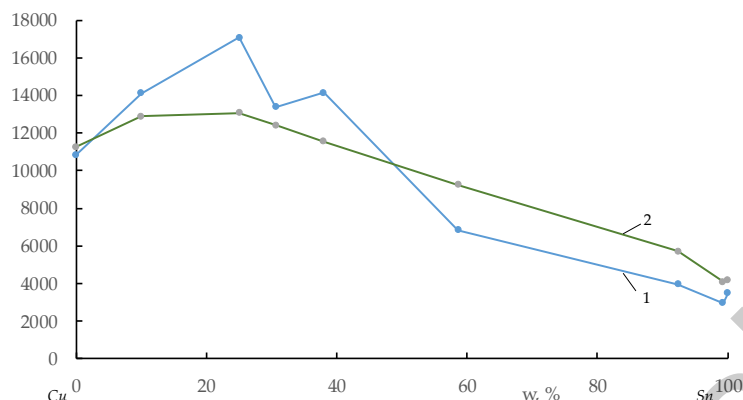


Рисунок 2 – Зависимость энергии активации вязкого течения E_a от энергии, затрачиваемой на хаотизацию системы. Близость скалярных значений энергии указывает на их действительную связь (причинно-следственную). Знак энергии противоположный, а величины отличаются всего на 5%

УДК 616-018:616:379-008.64.

ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ ЦИНКА В ПАНКРЕАТИЧЕСКИХ ОСТРОВКАХ, ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ И СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗАХ

Мейрамов Г.Г., Карагандинский университет имени академика Е.А. Букетова, Караганда, Казахстан

Согласно современным представлениям цинк занимает в организме животных и человека особое место, обладая исключительно высокой биологической активностью. Биологическое значение цинка обусловлено, главным образом, его участием во многих ферментативных системах. Цинк необходим для всех процессов, связанных с усиленным клеточным делением, активно участвует в метаболизме нуклеиновых кислот и синтезе белков [1,2].

Цинк принимает участие в метаболизме и обеспечении действия гормонов гипофиза, надпочечников, поджелудочной и предстательной железы, семенников [3,5]. Участие цинка в физиологических и патофизиологических процессах во многом зависит от его содержания в организме. Цинк обнаружен во всех клетках и органах, но его содержание в них различное. Распределение его в органах и тканях связано со значением этого элемента для специфической деятельности данного органа. Наиболее богаты цинком гипофиз, сетчатка глаза, предстательная железа.

Относительно большое содержание цинка обнаружено в поджелудочной железе [4], причем установлено его преобладание в панкреатических островках [5]. Высокий уровень микроэлемента в них связан с тем, что там происходит биосинтез инсулина, образуются цинксодержащие ферменты. Известно, что инсулин синтезируется и хранится в панкреатических β -клетках в виде кристаллов Zn^{2+} -инсулин (депо-форма) в соотношении 2:6 [2]. Полагают, что когда кристаллический инсулин высвобождается из β -клеток, его кристаллы растворяются и гексамер диссоциирует на активные мономеры инсулина и ионы Zn^{2+} [4].

По концентрации цинка предстательная железа превосходит более чем в 10 раз многие другие органы и ткани [5-7]. Значительные количества цинка в ней препятствуют воспалению и укрепляют местный иммунитет против инфекций.

Цинк необходим для нормального восприятия органов вкуса. Он стимулирует синтез густина – белка с большим содержанием гистидина, который находится в соке околоушных слюнных желез и отвечает за вкусовые ощущения в сосочках языка.

Существуют различные лабораторные методы определения концентрации цинка в биологических средах организма [9]. Наиболее широко используемыми на сегодняшний день являются следующие методы: пламенная атомно-абсорбционная спектрометрия, атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой, нейтронно-активационный анализ, X-Ray-спектрометрия, анодная инверсионная вольтамперометрия. Наряду с бесспорным преимуществом их по определению химических элементов в ничтожно малых количествах в различных объектах, они не могут быть пригодными для оценки динамики содержания жизненно важных металлов в клетках органов и тканей в условиях *in vivo* и *in vitro*, а также для выявления цитологических основ механизма развития ряда патологических состояний, обусловленных их дефицитом или избытком.

Наше внимание привлекли другие методы исследования, которые были лишены этих недостатков, обладали доступностью в исполнении при сохранении высокой чувствительности для выявления данного микроэлемента. Это дитизоновый гистохимический метод Дитизон (дифенилтиокарбазон, DZ) широко используется в аналитической химии для обнаружения ряда тяжелых металлов, в том числе и цинка, с которым он образует комплексные

соединения. При спектральном анализе максимум поглощения комплекса Zn^{2+} -DZ, извлеченного из панкреатических островков равен 530 нм, что соответствует таковому, полученному искусственным способом в результате взаимодействия ионов Zn^{2+} с дитизоном [4].

В 1961 г. Божевольнов Е.А. и Серебрякова Г.В. сообщили о способности 8-арен(сульфонил-амино)хинолинов формировать флюоресцирующие в ультрафиолетовом свете комплексы с цинком и кадмием. Одно из этих производных – 8 пара(толуолсульфониламино)хинолин (8ТСХ), обладает уникальной способностью прижизненно образовывать хелатирующие комплексы с ионами Zn^{2+} (соотношение 1:1) [8]. Данный метод гистохимического выявления цинка является строго специфичным и весьма чувствительным, позволяющим выявлять цинк в ничтожно малых количествах, не превышающих 10^{-7} - 10^{-8} [4,5]. В ультрафиолетовом свете при длине волны, равной 360-370 нм хелатирующий комплекс Zn-8ТСХ отчетливо флюоресцирует ярко зеленым светом [рис.1-3]. Следует также указать на то, что эти комплексообразователи обладают высоким химическим сродством к ионам Zn и в условиях *in vitro* формируют цветные хелатирующие комплексы, такие как комплексы 8-пара(толуолсульфониламино)хинолина - Zn^{2+} -8ТСХ, видимого при люминесцентной микроскопии и комплекса цинка с дитизоном - Zn^{2+} -DZ, наблюдаемого в виде ярко-красных гранул при микроскопии в темном поле [Рис.1.7., 1.8.]. Несомненным преимуществом гистохимических методов исследования является возможность визуально наблюдать в клетках тканей цинк в виде комплекса с красящим реагентом, а также исследовать гистотопографию ионов металла в клетке. Исходя из этих предпосылок, имеются основания полагать, что эти методы будут приемлемы для гистохимического выявления цинка в различных органах и тканях, отличающихся его содержанием как при физиологическом состоянии, так и при моделировании какой-либо патологии.

Цель исследования: выявить содержание цинка в панкреатических островках, предстательной и слюнных железах млекопитающих с помощью различных по чувствительности гистохимических методов.

Методика исследования

В острых и хронических опытах *in vivo* были использованы самцы 36 беспородных кроликов массой 2450-2850 г, и 48 белых мышей массой 30-36 г, которые были разделены на 4 равные группы. Все манипуляции с животными осуществляли в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 755 от 12.08.1077 г. МЗ СССР; приказ Министерства высшего и среднего специального образования СССР № 742 от 13.11.1984 г) и локальной этической комиссии. Выведение животных из эксперимента производилось эвтаназией под эфирным наркозом. Первую группу составили животные (кролики, мыши), у которых осуществляли прижизненное окрашивание тканей исследуемых органов (не более 10 мин) путем внутривенного введения диабетогенных комплексообразователей (дитизона и 8ТСХ), с последующим выведением их из эксперимента. Поджелудочную, предстательную и слюнные железы немедленно извлекали, замораживали в криостате и готовили из них срезы для последующей микроскопии (темно-полевая и, люминесцентная микроскопия).

У второй группы животных воспроизводили две модели экспериментального диабета, а именно: путем однократной внутривенной инъекции кроликам и мышам водно-аммиачного раствора дитизона (дифенилтиокарбазон) фирмы «SERVA» (Германия) в дозе 45 - 50 мг/кг и кроликам - спиртового раствора 8ТСХ (Институт чистых реактивов, ИРЕА, г. Москва, Россия) из расчета 36 - 38 мг/кг.

Во второй группе животным предварительно вводили через зонд сахароснижающий препарат второй генерации глибенкламид фирмы «BERLIN-CHEMIE/MENARINI (Германия) в дозе 20 мг/кг ежедневно в течение 3 сут. для максимальной элиминации цинка из клеток органов и тканей.

Контролем служили интактные животные (3 группа), которым для соблюдения эксперимента вводили эквивалентные объемы физиологического раствора. У животных трех групп после завершения срока исследования извлекали поджелудочную, предстательную и слюнные железы и фиксировали при температуре 0-5°C в 70% этаноле, насыщенном сероводородом.

Для цитохимической флюоресцентной реакции на Zn в исследуемых органах использовали 0,04% ацетоновый раствор 8ТСХ: 2-4 капли его наносили на депарафинированный срез или срез замороженной ткани желез с экспозицией не менее 10 сек, после чего препарат тщательно промывали дистиллированной водой и исследовали с помощью люминесцентной микроскопии

Для приготовления раствора дитизона выполняли следующие манипуляции: в широкую пробирку с притертой пробкой наливали 30 мл дистиллированной воды, добавляли 0,6 мл 25% раствора аммиака, 400 мг дитизона. Смесь перемешивали на водяной бане (70°C) в течение 10 мин, фильтровали через беззольный фильтр. Полученный фильтрат представлял собой 1% водно-аммиачный раствор дитизона, который мы использовали в наших исследованиях.

Световую и люминесцентную микроскопию срезов тканей поджелудочной железы проводили с помощью универсального микроскопа Axioplan 2 imagig фирмы «Carl Zeiss» (Германия) при увеличении от 140 до 280. Используя гистофлюориметрический комплекс, измеряли интенсивность флюоресценции или светопоглощения срезов тканей, окрашенных 8ТСХ или дитизоном соответственно. Цитохимические показатели содержания цинка, выявляемого благодаря образованию хелатного комплекса с этими реагентами, выражали в относительных единицах (о.е.) [10].

Результаты подсчетов заносили в специально разработанный протокол исследования и обрабатывали вариационно-статистическими методами с помощью программных пакетов Statistica 8,0 (Stat Soft Inc) и Microsoft Excel 2006 с вычислением среднего арифметического (M) и ошибку средней (m). После проверки распределения на нормальность значимость различий между группами оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Различия были достоверны при 95% пороге вероятности ($p < 0,005$).

Результаты исследования

В клетках эпителия концевых отделов предстательной железы интенсивность флюоресцентной реакции на цинк с 8ТСХ превосходила таковую в панкреатических β -клетках в 1,4-1,5 раз, как у животных I группы, так и в контрольной ($6,15 \pm 0,54$ о.е. против $4,10 \pm 0,14$ о.е. и $6,54 \pm 0,42$ о.е. против $4,45 \pm 0,22$ о.е. соответственно (табл.1,

рис. 1.1). Сходные результаты наблюдали и при фотометрии уровня светопоглощения в клетках предстательной железы, в которых образующийся дитизонат цинка был представлен в виде ярко-красных гранул (табл.1, рис. 1.3.;1.5).

Исследование уровня интенсивности свечения хелатируемого цинка и свечения дитизоната цинка в клетках слюнных желез позволило выявить превышение концентрации металла более чем в 1,3 и 1,4 раза сравнительно с таковыми показателями в β -клетках панкреатических островков поджелудочной железы соответственно (табл., рис.1.1; 1.4).

У животных второй серии опытов введение дитизона или 8-ТСХ сопровождалось развитием на 7-10 сут стойкого сахарного диабета, обусловленного избирательным разрушением панкреатических β -клеток продуктами реакции аккумулярованного в них Zn с поступившими в кровоток хелатов. Как видно из таблицы интенсивность флуоресценции β -клеток в островках поджелудочной железы животных I группы значительно уменьшалась в 2,7 раза по сравнению с таковой в контроле (III группа).

Аналогичная картина наблюдалась и при определении у данных животных уровня светопоглощения при реакции дитизона с цинком в панкреатических β -клетках, убыль которого составляла более чем в 2 раза. Следует отметить, что цинк сохранялся лишь только в α -клетках панкреатических островков, которые отчетливо выделялись на темном фоне (рис.1.6, 1.9), в то время как у интактных животных (контроль) панкреатические островки интенсивно либо флуоресцировали желто-зеленым светом в ультрафиолетовых лучах при нанесении на срез поджелудочной железы 8ТСХ, либо окрашивались дитизоном в ярко-красный цвет в темном поле (1.2, 1.3, 1.8).

Принимая во внимание, что введение дитизона и 8 ТСХ вызывает прочное блокирование цинка в клетках органов и тканей с последующей их деструкцией образующимся токсическим комплексом, необходимо было установить возможность проявления ими диабетогенного эффекта в условиях стимулированной мобилизации цинка из клеточных структур. С этой целью животным II группы ежедневно вводили сульфаниламидный противодиабетический препарат - глибенкламид (манинил), в основе эффекта которого существенную роль играет расщепление цинк-инсулинового комплекса в секреторных гранулах β -клеток и поступление в кровеносное русло растворимой молекулы инсулина и свободного цинка. Уровень флуоресценции панкреатических β -клеток свидетельствовал о явном снижении в 2.3-2,4 раза (на 57%) концентрации в них реакционно-способного цинка по сравнению с таковым в контроле (микрофото.1.2.). Окраска срезов поджелудочной железы дитизоном при микроскопии в темном поле также демонстрировала достоверную потерю цинка из цитоплазмы β -клеток (табл.1) сравнительно с контрольной группой ($p < 0,05$).

Особый интерес представляют данные о том, что подобные изменения в содержании цинка мы не наблюдали в клетках других органов (предстательная и слюнные железы), в которых уровни интенсивности люминесценции и светопоглощения существенно не отличались от подобных показателей в контрольных измерениях (табл.1) и находились в пределах допустимых погрешностей.

Этот факт свидетельствует, кроме того свидетельствует об избирательном влиянии глибенкламида на цинк-инсулиновый комплекс, локализующийся в виде депо-формы в секреторных гранулах панкреатических β -клеток, способствуя его расщеплению с последующей элиминацией цинка и инсулина. Наряду с этим следует отметить, что при введении животным 8ТСХ после производного сульфониломочевины - глибенкламида, ослабление реакции на цинк регистрировали только в панкреатических β -клетках и было связано с отсутствием цинка в В-клетках. В опытах с дитизоном реакция была отрицательной, так как цинк в В-клетках был связан с дитизоном и не мог быть гистохимически выявленным.

Таблица 1. Гистохимические методы выявления цинка в поджелудочной, предстательной и слюнных железах при различных условиях эксперимента ($M \pm m$)

Группы животных	Условия опыта	Содержания цинка в тканях, о.е.					
		Интенсивность флуоресценции			Уровень светопоглощения		
		Реакция на Zn с 8 ТСХ			Реакция на Zn с дитизоном (DZ)		
		поджелудочная железа β -клетки	предстательная железа	слюнная железа	поджелудочная железа β -клетки	предстательная железа	слюнная железа
I	Введение дитизона и 8 ТСХ интактным	4,10 \pm 0,14 n=16	6,15 \pm 0,5 4 n=16	5,70 \pm 0,5 4 n=16	3,82 \pm 0,2 6 n=16	5,72 \pm 0,31 n=16	5,56 \pm 0,34 n=16
II	Животные с экспериментальным диабетом	1,66 \pm 0,05* n=14	2,28 \pm 0,1 6* n=14	2,09 \pm 0,1 2* n=14	1,72 \pm 0,0 9* n=14	2,11 \pm 0,09* n=14	3,34 \pm 0,44* n=14
III	Интактные животные (контроль)	4,45 \pm 0,22 n=27	6,54 \pm 0,4 2 n=27	5,88 \pm 0,4 0 n=27	4,06 \pm 0,1 0 n=27	5,46 \pm 0,28 n=27	5,94 \pm 0,52 n=27

Примечание: n – число определений; *- $p < 0,05$ по сравнению с группой

Рис.1. Микрофотографии гистологических препаратов поджелудочной железы, предстательной и слюнных желез, окрашенных на цинк дитизоном и 8ТСХ

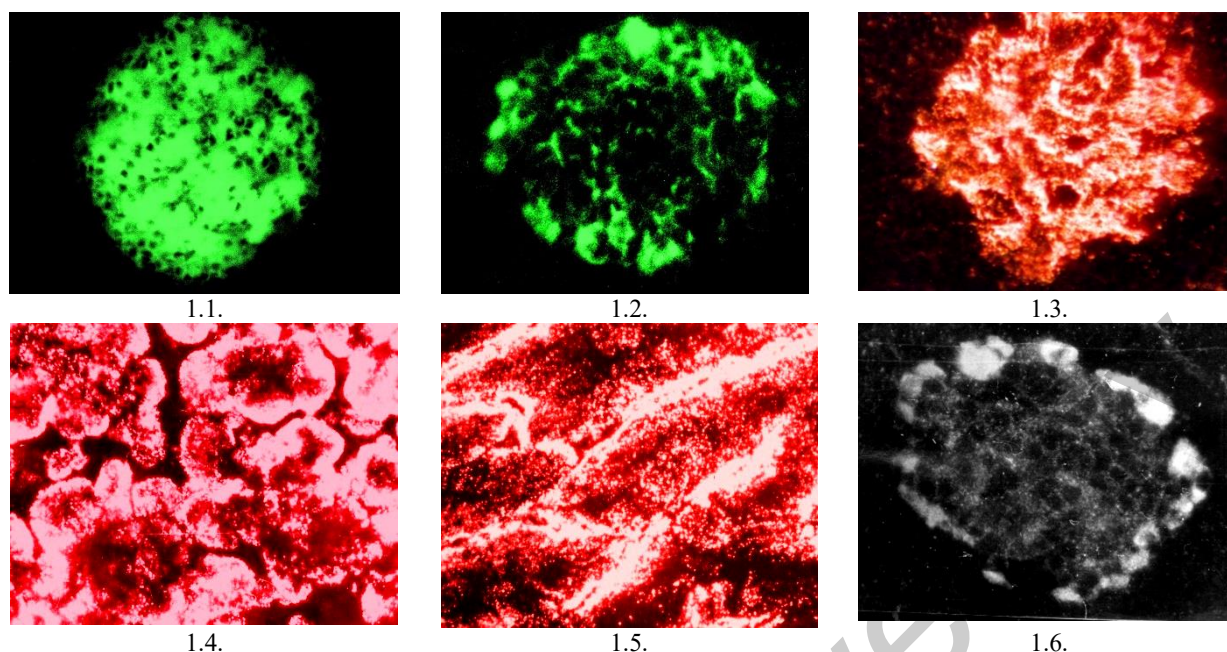


Fig.1. Гистохимические методы выявления цинка в панкреатических В-клетках, в предстательной и слюнных железах

1.1. Замороженный срез поджелудочной железы кролика через 10 мин. после введения 8ТСХ. Флюоресценция комплекса цинк- 8ТСХ в панкреатическом островке; люминесцентная микроскопия; x280;

1.2. Замороженный срез поджелудочной железы кролика через 72 час. после выведения цинк-инсулинового комплекса из В-клеток и последующего введения 8ТСХ. Ослабление реакции на цинк; люминесцентная микроскопия; x280;

1.3. Замороженный срез поджелудочной железы кролика через 10 мин. после введения дитизона. Яркие красные зерна литизоната цинка в В-клетках; темно-полевая микроскопия; x280;

1.4. Замороженный срез ткани слюнной железы через 10 мин. после введения дитизона. Яркое красное свечение комплекса цинк-дитизон; темно-полевая микроскопия; x280;

1.5. Замороженный срез ткани предстательной железы через 10 мин. после введения дитизона. Яркое красное свечение комплекса

1.6. Замороженный срез поджелудочной железы интактного кролика; темно-полевая микроскопия; x280;

Гистохимический метод с использованием 8-пара (толуолсульфониламино)хинолина является наиболее высокочувствительным и строго специфичным в отношении цинка, образуя с ним специфический хелатный комплекс, флюоресцирующий в ультрафиолетовых лучах [4,8], что позволяет выявлять гистохимически ничтожные количества цинка в ткани.

Достоинством второго, дитизонного метода гистохимического выявления цинка, является его особенность, связанная со способностью не диффузно окрашивать, содержащийся в цитоплазме клеток металл, а формировать ярко красные гранулы комплекса цинк-дитизон в соотношении 2:1, что позволяет исследовать цитотопографию металла в различных частях панкреатических В-клеток.

Таким образом, результаты сравнительного анализа двух гистохимических методов выявления содержания цинка в клетках различных органов позволяют судить о их высокой чувствительности и возможности эффективного использования при проведении исследований содержания цинка в клетках вышеназванных тканей организма.

Список использованной литературы

1. Davis S.R., McMachon R.J., Cousins R.J. Metallothionein knockout and transgenic mice exhibit altered intestinal processing of zinc with uniform zinc-dependent zinc transporter-1 expression // *J.Nutr.*- 1998. Vol. 128.- № 5.- P. 825-831.
2. Chimienti, F. Zinc, pancreatic islet cell function and diabetes: new insights into an old story // *Nutr. Res Rev.*- 2013. -Vol. 26,- № 1.- P. 1-11.
3. Franklin R.B., Feng P. Mitochondrial function, zinc, and intermediary metabolism relationships in normal prostate and prostate cancer // *Mitochondrion.*- 2005.- № 5.- P.143-153.
4. Лазарис Я.А., Мейрамов Г.Г.. К механизму повреждения панкреатических островков при дитизоновом диабете // *Бюллетень эксперим. биологии и медицины.*- 1974.-3.-С.19-22
5. Мейрамова А.Г. Диабетогенные цинксвязывающие В-цитотоксические соединения // *Проблемы эндокринологии.* Москва.- 2003.- Т. 49,- № 2.- С. 8 – 16.

6. Hambidge K.M., Miller L.V., Westcott J.E., Sheng X., Krebs N.F. Zinc bioavailability and homeostasis // Am. J. Clin. Nutr.- 2010.- Vol. 91.- P. 1478–1483.
7. Lavrova A.E. The biological role of Zinc Лаврова А.Е. The biological role of zinc is normal conditions and at diseases // Russian Journal of Pediatrics.- 2000.- № 3.- P. 42-47.
8. Божевольнов Е.А., Серебрякова Г.В. 8-п-тозиламинохинолиновый люминесцентный реактив на цинк и кадмий // Химические реактивы и препараты.- М.-1961.- С.36-42.
9. Okazuki Y., Namikawa K., Minami T. Studies of metals and metallothionein in tissue // Yakugaku Zasshi.- 2000.- Vol. 120.- № 3.- P. 282-289.
10. Мейрамов Г.Г. Кикимбаева А.А., Мейрамова А.Г. Гистофлюориметрический метод определения содержания инсулина в панкреатических В-клетках. Препатент No.18352 от 01.18.2007 выданный Комитетом по Интеллектуальной собственности Министерства Юстиции Казахстана

UDC 547.057:547.94

SYNTHESIS AND HEMORHEOLOGICAL ACTIVITY OF NEW NAPHTHYL - CONTAINING THIOSEMICARBAZIDES

Mendibayeva A.Zh., Institute of Organic Synthesis and Coal Chemistry of the Republic of Kazakhstan, Karaganda, Kazakhstan; Karaganda industrial university, Temirtau, Kazakhstan

Muldakhmetov Z.M., Institute of Organic Synthesis and Coal Chemistry of the Republic of Kazakhstan, Karaganda, Kazakhstan

Nurkenov O.A., Institute of Organic Synthesis and Coal Chemistry of the Republic of Kazakhstan, Karaganda, Kazakhstan; Karaganda industrial university, Temirtau, Kazakhstan;

Fazylov S.D., Institute of Organic Synthesis and Coal Chemistry of the Republic of Kazakhstan, Karaganda, Kazakhstan

Akhmetkarimova Zh.S., National center of biotechnology, Astana, Kazakhstan

Syzdykov A.K., Institute of Organic Synthesis and Coal Chemistry of the Republic of Kazakhstan, Karaganda, Kazakhstan; Karaganda industrial university, Temirtau, Kazakhstan;

This paper presents the results of a study of the synthesis, structure, and hemorheological activity of naphthyl-containing thiosemicarbazides (*in vitro*). The main idea in this research was to try to create biologically active molecules with maximum therapeutic activity and a wide range of hemorheological activity and a favorable safety profile. In this context, naphthyl-containing compounds represent as yet unexplored and promising research objects. Their diversity and functional flexibility determine their widespread use as medicines, as well as in the synthesis of other biologically active compounds used in the pharmaceutical, agrochemical and biotechnological industries [1,2]. Naphthyl-containing derivatives, having high antimicrobial activity and significant pharmacological potential, have found wide application in pharmacology. Their ability to participate in a variety of chemical modifications opens up opportunities for the targeted synthesis of compounds with specified properties [3].

Organosulfur compounds represent one of the most widespread and studied classes of organic substances with unique physico-chemical properties and high biological potential. The chemical structure of organosulfur compounds is extremely diverse, due to the content in their structure of fragments with such types of bonds as C–S, C=S, SH, C–N–S, etc. [2]. Compounds based on thiosemicarbazides, which are widely used as components of antimicrobial, anti-tuberculosis and other medicines, are of particular scientific and practical value among organosulfur derivatives. These substances are widely used as a platform for the development of antimicrobial drugs.

It should be noted that pathological changes in the rheological properties of blood occupy a key place in the pathogenesis of a number of severe chronic and acute diseases, such as ischemic stroke, myocardial infarction, hypertension, bronchial asthma, diabetes mellitus and others. Despite the achievements in the field of studying the molecular mechanisms of hemorheological disorders, the arsenal of effective pharmacological agents capable of correcting these changes remains extremely limited [4]. To date, the most widely used drugs are pentoxifylline, clopidogrel, ticlopidine, aspirin, and lipid-lowering drugs [5]. However, their use is associated with a number of limitations due to insufficient efficacy and a high frequency of side effects, including dyspeptic disorders, intestinal bleeding, skin hemorrhages, leukopenia, thrombocytopenia and agranulocytosis.

These circumstances necessitate the search for new classes of compounds with pronounced hemorheological activity and a favorable safety profile. In this context, naphthyl-containing thiosemicarbazides represent promising research objects that can significantly replenish the arsenal of pharmacological correction of hemorheological disorders. In a series of studies conducted on the basis of the National Center of Biotechnology, the presence of hemorheological activity in a number of naphthyl-containing thiosemicarbazides was established, which confirms the prospects of these compounds for the further development of new effective correctors of disorders of rheological properties of blood.

It is known from the literature [6] that many hydrazides are not only important pharmacologically active drugs and exhibit a wide range of high physiological activity, but also serve as initial synthons for further modifications. One of the well-known methods of using hydrazides is the method of obtaining a thiosemicarbazide framework based on them, since it is known that many thiosemicarbazide and thioamide derivatives (thioacetazone - thiosemicarbazone *n*-acetaminobenzaldehyde, α -methylbenzylthiourea, etc.) have bacteriostatic and antiviral activity [7]. The isothiocyanate