

УДК 574:31:002.

Г.Г.Мейрамов, А.А.Кикимбаева, Ф.А.Миндубаева, Г.О.Жузбаева, Л.Г.Тургунова,
А.Г.Мейрамова, О.Л.Коваленко, А.П.Андреева, А.А.Жузжасарова

*Диабетологический исследовательский центр,
Карагандинский государственный университет им. Е.А.Букетова (E-mail: meyramow@mail.ru)*

Гистохимическое выявление Zn^{2+} -инсулинового комплекса в В-клетках панкреатических островков

В статье предложен метод гистохимического выявления в панкреатических В-клетках одновременно инсулина и ионов Zn^{2+} , участвующих в его депонировании. Отмечено, что метод основан на окраске в замороженных срезах поджелудочной железы комплекса « Zn^{2+} -инсулин» дитизином, окрашивающим комплекс в ярко-красный цвет. Определено, что интенсивность окраски может быть оценена количественно с помощью фотометрии. Доказано, что метод позволяет выявлять гистохимически как инсулин, так и содержание ионов Zn^{2+} в В-клетках. Авторами метод рекомендован для использования в виде прижизненной гистохимической реакции.

Ключевые слова: диабет, депонирование инсулина, В-клетки, ионы Zn^{2+} , срезы, ткани, поджелудочная железа, маркеры, гистохимические исследования.

Известно, что цинку принадлежит важная роль в процессах депонирования инсулина в В-клетках кроликов, кошек, мышей, белых крыс, лошадей, собак, человека [1–4]. Синтезированный в В-клетках инсулин соединяется с имеющимся в В-гранулах цитоплазмы В-клеток цинком, образуя депо-форму. Цинк, выявленный методом электронной гистохимии [5], содержится только в В-гранулах, а в других органеллах В-клеток и в ее цитоплазме не обнаружен.

Разрушение В-клеток сопровождается параллельным снижением в их цитоплазме как инсулина, так и цинка. Резкое снижение содержания цинка в В-клетках происходит при тяжелых формах сахарного диабета. В подавляющем большинстве случаев наблюдается строгий параллелизм между содержанием в В-клетках ионов Zn^{2+} и инсулина.

Однако в отдельных, редких, искусственно созданных экспериментальных условиях, не связанных с наличием сахарного диабета, такой параллелизм может отсутствовать. В отсутствие диабета снижение содержания цинка в В-клетках может свидетельствовать о нарушении обмена цинка или о его временной мобилизации из В-клеток, например, при введении высоких доз сульфаниламидных сахароснижающих препаратов животным, что, в свою очередь, создает условия для нарушения процессов депонирования инсулина в клетках. То есть гистохимическими методами ионы в клетках при этом не выявляются ввиду их отсутствия, однако способность В-клеток синтезировать инсулин при этом не нарушается, нарушаются лишь процессы его депонирования, которые быстро восстанавливаются при прекращении действия причин, приводящих к мобилизации ионов Zn^{2+} из В-клеток.

Известен абсолютно специфичный флюоресцентный метод определения ионов Zn^{2+} , однако химически он выявляет только ионы данного металла и не может служить критерием оценки содержания инсулина в цитоплазме клеток [6–8].

Существующие методы гистохимического выявления инсулина в В-клетках — иммуногистохимический, иммунофлюоресцентный, альдегидфуксиновый, псевдоизоцианиновый, Виктория-4 [9–16], являясь специфичными или абсолютно специфичными в отношении инсулина, имеют 3 существенных недостатка, ограничивающих их применение. Реактивы и антисыворотки, необходимые для

них, весьма дороги и выпускаются ограниченным числом западных фирм. Кроме того, химически они выявляют только инсулин, не являясь маркерами собственно ионов цинка. Наконец, перечисленные выше методы, оценивая содержание инсулина в В-клетках, не позволяют судить о способности клеток депонировать синтезированный гормон с помощью ионов Zn^{2+} , поскольку его содержание ими не оценивается.

Нами ставилась задача — разработать способ гистохимического выявления инсулина и одновременно ионов Zn^{2+} в панкреатических В-клетках с тем, чтобы оказалось возможным оценивать не только содержание инсулина в В-клетках, но и одновременно ионов Zn^{2+} . Это позволило бы дополнительно судить о способности клеток депонировать, а не только синтезировать инсулин.

Предлагаемый способ количественной оценки содержания депонированного инсулина в окрашенных на инсулин В-клетках панкреатических островков поджелудочной железы основан на формировании окрашенного в красный цвет комплекса « Zn^{2+} -дитизон», выявляемого в панкреатических островках срезов ткани поджелудочной железы с помощью темнопольной микроскопии путем окраски В-клеток двумя путями: 1) введением раствора дифенилтиокарбазона (дитизона) животным внутривенно с последующей микроскопией препаратов замороженной поджелудочной железы; 2) окраской парафиновых или замороженных срезов поджелудочной железы раствором дитизона. Методом спектрального анализа подтверждено, что образующиеся в В-клетках ярко-красные гранулы химически являются комплексом « Zn^{2+} -дитизон» и имеют тот же спектр поглощения, равный 580 нм, что и синтезированный химическим путем дитизонат цинка [17]. Поскольку ионы Zn^{2+} в В-клетках находятся в связанном с инсулином состоянии, образуя депоформу гормона, данный метод одновременно позволяет судить и о содержании инсулина в клетках. Удаление дитизоната цинка из В-клеток сопровождается и удалением инсулина, связанного с цинком в виде депоформы, о чем свидетельствует полное отсутствие инсулина в В-клетке, выявляемое высокоспецифичными гистохимическими методами [17].

Материалы и методы исследования

В опытах использованы 14 беспородных кроликов массой 2480–3060 г. Животным внутривенно вводился водно-аммиачный раствор дитизона («MERCK», ФРГ), приготовленный следующим образом: 200 мг дитизона вносится в колбу с притертой пробкой, содержащую 25 мл дистиллированной воды, добавляется 0,2 мл 25 %-ного раствора аммиака, затем смесь встряхивается в течение 10 мин на водяной бане при температуре $+70^{\circ}C$. После этого раствор охлаждался и медленно вводился внутривенно из расчета 45–50 мг/кг. Точная концентрация устанавливалась путем вычета нерастворившегося порошка дитизона, оставшегося на фильтре после его высушивания. Извлеченная поджелудочная железа замораживалась в криостате, после чего замороженные срезы толщиной 4–5 мкм исследовались в темном поле микроскопа.

Результаты исследования

В поле зрения видны островки, содержащие обильную ярко-красную зернистость, особенно плотно располагающуюся вокруг стенок кровеносных сосудов, т.е. там, где концентрируется наибольшее количество депонированного инсулина (рис.1, 2), тогда как в В-клетках поджелудочной железы животных с экспериментальным диабетом зернистость полностью отсутствовала, как и ионы Zn^{2+} (рис.3), по сравнению с резко положительной реакцией на цинк в препаратах интактных животных (рис.4). Данная зернистость является комплексом « Zn^{2+} -дитизон», что подтверждено результатами спектрального анализа [17]. Интенсивность окраски можно оценить количественно путем фотометрии, с получением количественных данных в относительных единицах [15].

Этим же раствором можно окрашивать срезы замороженной ткани поджелудочной железы, не вводя его внутривенно, а нанося на срез на 2 минуты, после чего раствор дитизона смывается со среза дистиллированной водой. Однако качественные результаты такой окраски всегда уступают результатам, полученным способом, описанным выше: гистотопография комплекса в этом случае выявляется хуже.

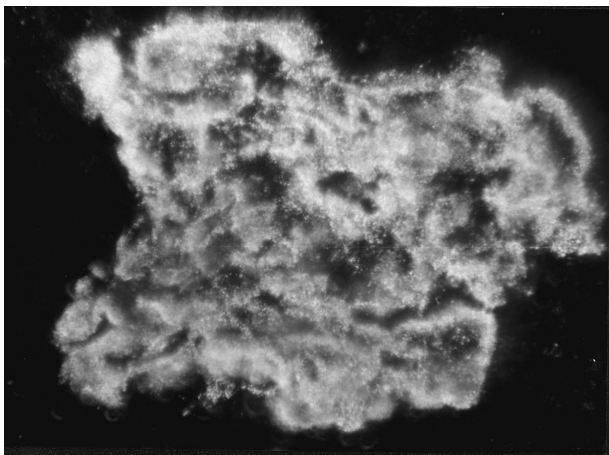


Рисунок 1. Комплекс « Zn^{2+} -инсулин» (гранулы красного цвета) в В-клетках поджелудочной железы кролика после внутривенного введения дитизона (48,9 мг/кг). Темнополевая микроскопия. Ув. 7x40

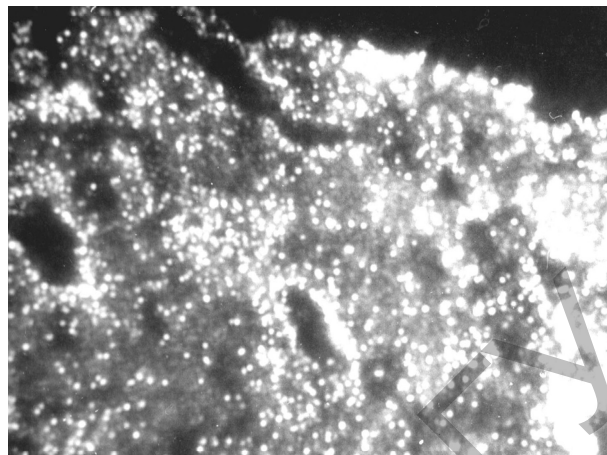


Рисунок 2. Преимущественная локализация комплекса « Zn^{2+} -инсулин» вокруг кровеносных сосудов (на микрофото гранулы окрашены в белый цвет) в В-клетках поджелудочной железы белой мыши после внутривенного введения дитизона (46,7 мг/кг). Темнополевая микроскопия. Ув. 7x40



Рисунок 3. Отрицательная люминесцентная реакция на ионы Zn^{2+} в В-клетках поджелудочной железы кролика с экспериментальным сахарным диабетом. Реакция с 8ТСХ. Ув. 5x40

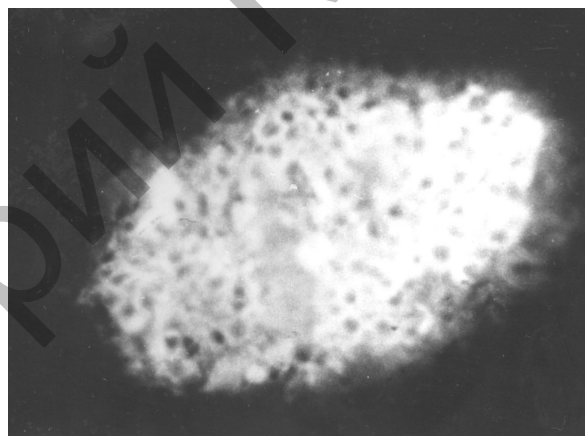


Рисунок 4. Положительная люминесцентная реакция на ионы Zn^{2+} в В-клетках поджелудочной железы интактного кролика. Реакция с 8ТСХ. Ув. 5x40

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что с помощью данного гистохимического метода в панкреатических В-клетках можно выявлять инсулин в комплексе с ионами Zn^{2+} , что позволяет судить как о содержании инсулина в клетке, так и, по содержанию ионов Zn^{2+} , о способности ее к депонированию гормона. Локализация ионов Zn^{2+} в цитоплазме В-клеток в точности повторяет расположение инсулина [3,15,17]. Практически всегда наблюдается строгий параллелизм между содержанием депонированного инсулина и ионов Zn^{2+} , и лишь в двух случаях он может нарушаться. Это наблюдается, если ионы Zn^{2+} искусственно вымываются из В-клеток либо если они связаны с введенными извне хелаторами — производными дитиокарбаминовой кислоты. В этих крайне редко встречающихся случаях параллелизм нарушается, т.е. инсулин в клетке сохраняется, но реакция на цинк бывает отрицательной в результате его отсутствия или его конкурентного связывания с солями дитиокарбаминовой кислоты, которая, не снижая количества ионов Zn^{2+} в В-клетках, не дает возможности выявления его с помощью маркеров на цинк.

References

- 1 Okamoto K. Experimental pathology of diabetes mellitus // Tohoku Journal of Exper. Medicine. — 1975. — Vol. 61. — Suppl. 1–2. — P. 1–61.
- 2 Meyramov G.G., Meyramova A.G. Zn as Cause of Diabetes Induced by Chelators and as Cause of its Prevention // DIABETES. The Journal of American Diabetes Association, USA. — 2002. — Vol. 51. — № 6. — P. 591–592.
- 3 Lapin W.I., Meyramov G.G., Korchin W.I., Sotosin W.A. Table of contents of zinc and insulin in B-cells of small islands of Langergans at an experimental alloxanic diabetes // Of Patholog. Phisiol. experim.therap. — 1973. — № 4. — P. 36–39.
- 4 Okamoto K. Experimental pathology of diabetes mellitus // Diabetes Mellitus: Theory and Practice. — New York. — 1970. — P. 256–264.
- 5 Okamoto K., Kawanishi H. Submicroscopic histochemical demonstration of intracellular reactive zinc in B-cells of pancreatic islets // Endocrinol. Jap. — 1966. — Vol. 13. — № 3. — P. 305–318.
- 6 Bozhevovnov E.A., Serebrjakova G.V. 8-п-тозиламинокхинолиновы luminescent reagent on zinc and cadmium // The Chemical reagents and preparations. — Moscow, 1961. — С. 36–42.
- 7 Meyramov G.G., Meyramova R.G. The High Specificical Histochemical Method Revealing of Zn-ions in B-cells of Isolated Pancreatic islets // DIABETES. The Journal of American Diabetes Association. — 1991. — Vol. 40. — Suppl. 1. — P. 65.
- 8 Meyramov G.G., Meyramova A.G. 8-PTSQ as Fluorescent Reagent for Reve aling of Zn-ions in B-cells and as Diabetogenic Chelator // ACTA DIABETOLOGICA. The European Diabetes Journal. — 2003. — SPRINGER. — 2003. — Vol. 40. — № 1. — P. 57.
- 9 Kvistberg D., Lester G., Lasarov A. Staining of Insulin with Aldehydefuchsin // Journal Histochem and Cytochem. — 1966. — Vol. 14. — P. 609–611.
- 10 Meyramov G.G., Niedderer H. The Histofunctional Method Appreciating of Functional State of Isolated Pancreatic B-cells in the Tissue of Culture // Diabetes Research. and Clinical Practice. The Journal of International Diabetes Federation. Amsterdam-New York, 1988. — Vol. 5. — P. 228.
- 11 Wohlrab F., Dorsche H., Krautschick I., Schmidt S. On the specifity of the Insulin staining by Victoria Blue 4R // Histochem J. — 1985. — Vol. 17. — P. 515–518.
- 12 Meyramova A.G., Kikimbaeva A.A., Meyramov G.G. Victoria 4 Method Staining of Insulin in B-cells of Isolated Pancreatic Islets // ACTA DIABETOLOGICA. The European Diabetes Journal. «SPRINGER». — 2003. — Vol. 40. — № 4. — P. 208.
- 13 Schiebler T.H., Schiessler S. Uber den Nachweis von Insulin mit den metachromatisch reagie- renden Pseudoisocyaninen // Histochemie. — 1959. — Vol. 1. — S. 445–465.
- 14 Coalson R.E. Pseudoisocyanin staining of insulin and specifity of emperical islet cell stain // Stain Technol. — 1966. — № 2. — P. 121–129.
- 15 Meyramov G.G., Tusupbekova G.T., Meyramova R.G. Gistoflyuorimetrical method of determination of maintenance of insulin in pancreatic B-cells // Of Problem of endocrinology. — 1987. — № 5. — P. 49–51.
- 16 Meyramov G.G., Kikimbaeva A.A., Meyramova A.G. Fluorescent Histochemical method Staining of Insulin in B-cells of Isolated Pancreatic islets by Diethylpseudoisocyanine Chloride // ACTA DIABETOLOGICA. The European Diabetes Journal. — 2005. — SPRINGER. — Vol. 42. — № 1. — P. 66.
- 17 Lasaris Ya.A., Meyramov G.G. К выяснению роли блокирования цинка в патогенезе дитизонного диабета // Of Problem of endocrinology. — 1974. — Vol. 20. — № 5. — P. 90–94.

Ғ.Ғ.Мейрамов, А.А.Қиқымбаева, Ф.А.Миндубаева, Г.Ө.Жүзбаева, Л.Г.Тұрғынова,
А.Ғ.Мейрамова, О.Л.Коваленко, А.П.Андреева, А.А.Жүзжасарова

В-жасушаларының панкреатиттік аралшықтарында Zn^{2+} -инсулин кешенінің гистохимиялық зерттелуі

Авторлар ұсынып отырған әдіс бойынша панкреатиттік В-клеткаларында бір мезгілде инсулин мен Zn^{2+} иондардың жинақталуын анықтауға болады. Әдіс мұздатылған қарын асты безінің жұқа кесінділерін « Zn^{2+} -инсулин» кешенін дитизонмен бояғанда кешеннің ашық қызыл түске боялуына негізделген. Боялу қарқындылығы фотометрия әдісімен анықталды. Бұл әдіс инсулиннің де, Zn^{2+} иондарының да мөлшерін гистохимиялық зерттеуге мүмкіндік берді. Осы әдістерді тірі күйде гистохимиялық реакция ретінде қолдану ұсынылған.

G.G.Meyramov, A.A.Kikimbayeva, F.A.Mindubayeva, G.O.Zhuzbayeva, L.G.Turgunova,
A.G.Meyramova, O.L.Kovalenko, A.P.Andreeva, A.A.Zhuzzhasarova

The Histochemical Revealing of Zn²⁺-Insulin Complex In Pancreatic B-cells

Authors are presented a method for histochemical staining in pancreatic B-cells as of deposited insulin as Zn²⁺-ions located in cytoplasm of cells. This thechnic is adopted for staining at frozed sections of pancreas tissue of Zn²⁺-insulin complex by Diphenilthio-carbazone (Dithizon). Density of colour is measured photometrically. It is possible to estimate by this method not only insulin content in B-cells but Zn²⁺-ions amount too. Thus, ability of B-cells for storage of insulin as Zn²⁺-ions in cells maybe estimated contrary to other specific histochemical staining technics for revealing of insulin. Preferably this method is recommended for using as vital histochemical technic on frozed section of pancreas tissue.

УДК 591.:595.762.:595.763

В.С.Абукенова, Г.Е.Нурсултан

Мезофауна участков сосновых лесопосадок окрестностей г. Караганды

Карагандинский государственный университет им. Е.А.Букетова (E-mail: abu-veronika@yandex.ru)

В статье приведены сведения о беспозвоночных, обитающих в почвах разновозрастных участков сосновых лесопосадок окрестностей г. Караганды. Определена общая численность, доминирующие трофические группы и фоновые виды. Показана динамика почвенной влажности и температуры почвенных горизонтов. Выявлена взаимосвязь почвенно-растительных условий и экологических предпочтений. Предложены рекомендации для закладки сосновых лесополос в районе города.

Ключевые слова: мезофауна, почвенные пробы, ловушки Барбера, общая уловистость, численность, доминантные группы, кодоминанты, трофическая структура.

Исследования почвенной фауны как техногенных, так и природных ландшафтов за последние 15–20 лет подтвердили, что комплекс видов педобионтов может быть успешно использован для выяснения общих закономерностей происходящих сукцессионных процессов в биоценозах. В городском культурном ландшафте почвенные животные остаются последним «реликтом» бывшего некогда естественного животного населения. Но почва и ее население здесь сильно изменены городской средой. Однако в черте города существуют территории, использование которых приводит к развитию высококультурных почв — это лесопосадки. В городах лесопосадочные полосы служат незаменимым источником биоразнообразия. Здесь повышено разнообразие растительного покрова, где зачастую произрастают растения, не характерные для природной зоны города. Многие животные находят для себя убежище под покровом древесной и травяной растительности. Для того чтобы такие участки были устойчивы, должно проводиться за ними слежение — мониторинг, частью которого и является данная работа. Интерес к теме обусловлен почти полным отсутствием сведений о структуре и динамике комплексов мезофауны городской среды [1, 2]. Цель нашей работы — установление структуры и динамических особенностей мезофауны сосновых лесопосадок окрестностей г. Караганды.

Материалы и методы исследования

Исследования были проведены в июле 2011 г. Земельный участок лесопосадок площадью в 10 га расположен в районе Пришахтинска г. Караганды. Фонообразующей породой является сосна. Из травянистой растительности здесь произрастают: пырей ползучий, пастушья сумка, ячмень гривистый, полынь, житняк, остролодочник, донник лекарственный и др. Также на данном участке встречаются кустарники: шиповник собачий, смородина золотистая и др. Рельеф представляет собой равнину с понижениями на юго-востоке. Почва светло-каштановая, глинистая, содержит недостаточное количество гумуса. Относится к карбонатным солонцеватым почвам, так как содержит глину, которая не даёт полного промыва почвы. По механическому составу тяжелая, на ощупь комковатая, влажная.