

А.Г.Мейрамова¹, Ж.А.Абылайулы², Ф.А.Миндубаева¹, Б.С.Имашева³,
А.А.Кикимбаева³, З.К.Исаева³, Г.Г.Мейрамов⁴

¹ Карагандинский медицинский университет;

² Институт кардиологии внутренних болезней, Алматы;

³ Медицинский университет, Астана;

⁴ Карагандинский государственный университет им. Е.А.Букедова

ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СОСТОЯНИЯ ПАНКРЕАТИЧЕСКИХ ОСТРОВКОВ В УСЛОВИЯХ ДЕЙСТВИЯ 5-АМИНО-8-ОКСИХИНОЛИНА*

Мақалада 5-амино-8-оксихинолиннің адамның ағзасына әсері баяндалады. Зерттеулерде қолдан синтезделген 5АОХ А және В клеткаларының қабығының қаблетіне және ұйқы безінің аралшықтарының В-клеткаларының ультрақұрылымына әсері анықталады.

Direct action of 5-amino-8-oxiquinolin (5AOX) on Rat's pancreatic islets result destruction of cell's matrix as of B-granules and by reducing of insulin content in cytoplasm of B-cells. Administration of complex 5-AOX-Zn in nutria media result not marked changes of cells located on the surface of islets.

5-амино-8-оксихинолин (5 АОХ) является одним из диабетогенных производных 8-оксихинолина. Исследование механизмов диабетогенного действия 5 АОХ позволило установить, что основные два из них обусловлены взаимодействием 5 АОХ с ионами цинка [1, 2], с образованием комплекса 5 АОХ-Zn состава 1:1, являющегося наиболее токсичным для клеток [3] и оказывающего разрушающее воздействие на них. Задача исследования состояла в изучении характера прямого влияния искусственно синтезированного комплекса 5 АОХ-Zn на состояние поверхности А- и В-клеток и ультраструктур В-клеток панкреатических островков в сравнении с действием только 5 АОХ.

Материал и методы. Опыты проведены на 7-дневных крысах линии LEWIS. Изолированные с помощью коллагеназы панкреатические островки после очистки помещались в питательную среду 199, куда затем добавлялась среда, содержащая комплекс 5 АОХ-Zn. Для этого данный комплекс был получен в результате взаимодействия 0,8 %-ного раствора 5 АОХ или 8000 мкг/мл, приготовленного на питательной среде 199 при рН=7,3–7,4, с добавлением 2,5 мл 10 %-ного раствора ZnSO₄. Реакция рассчитывалась таким образом, чтобы обеспечить практически полное связывание ионов цинка, содержащихся в растворе 5 АОХ. Полученный раствор добавляли к свежей питательной среде в соотношении 1:30; концентрация 5 АОХ в составе комплекса при этом составила около 265 мкг/мл. В него помещались изолированные островки, которые инкубировались при температуре +37⁰ С с добавлением О₂ в течение 2 часов, после чего их высушивали с помощью углекислоты, напыляли золотом и исследовали в сканирующем электронном микроскопе S-570 «Hitachi» при ускоряющем напряжении 15 кв. Контрольные островки инкубировали в питательной среде, содержавшей 5 АОХ из расчета 282 мкг/мл среды в течение 2-х часов, после чего фиксировали в жидкости Буэна. Парафиновые срезы окрашивали альдегидфуксином [13], псевдоизоцианином [14] и исследовали в световом и люминесцентном микроскопах.

Для трансмиссионной микроскопии водно-спиртовой раствор 5 АОХ вводили беспородным кроликам массой 2000–2250 г внутривенно в количестве 46,4–49,5 мг/кг, после чего животных умерщвляли воздушной эмболией; кусочки поджелудочной железы фиксировали в 2,5 %-ном растворе глутарового альдегида и ультратонкие срезы контрастировали уранил-ацетатом по Рейнольдсу, после чего препараты исследовали в трансмиссионном микроскопе JEM-7A при ускоряющем напряжении 100 кв.

Результаты и их обсуждение

Анализ сканнограмм позволил выявить следующее. Интактные островки имеют правильную округлую или овальную форму, А-клетки относительно ровным слоем покрывают большую часть поверхности островка. В местах их отсутствия, в углублениях выявляются отдельные В-клетки. Как А-клетки, так и В-клетки имеют гладкую, правильную сферическую поверхность, тесно примыкают друг к другу и в местах их контакта какой-либо просвет отсутствует.

В опытных островках располагающаяся на их поверхности большая часть А-клеток сохраняли правильную сферическую форму, но поверхность большинства А-клеток теряла свою гладкость и

* Все авторы статьи входят в диабетологическую исследовательскую группу (Караганда)

становилась пористой; на отдельных участках клеточная мембрана была разрушена. Местами несколько разрушенных клеток сливаются в бесструктурную массу. Границы между отдельными клетками часто не прослеживаются и местами участки его сферической поверхности имеют вид неструктурированной, относительно гладкой гомогенной массы (рис. 1, 2).

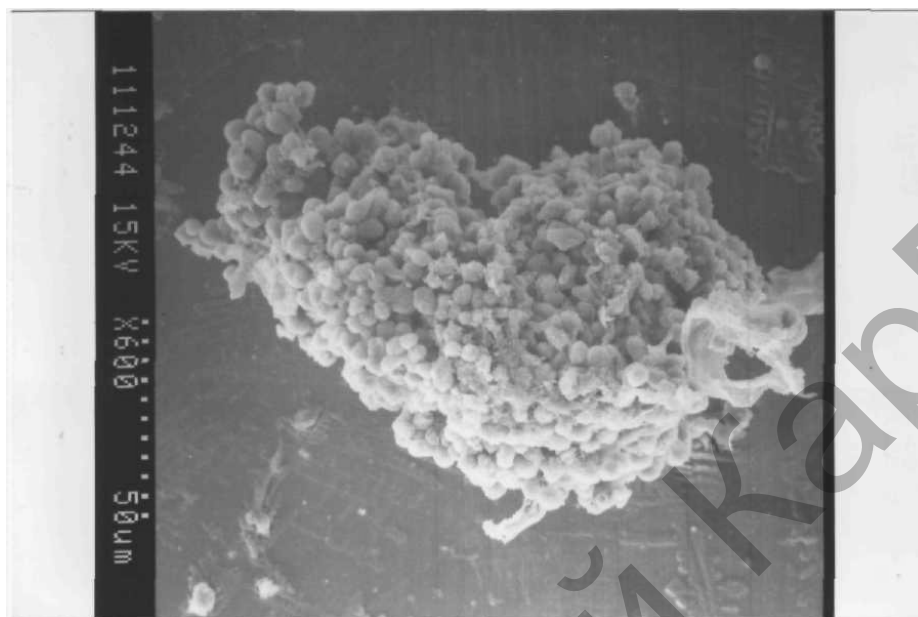


Рис. 1. Сканирующая электронная микроскопия. Панкреатический островок интактной белой крысы. А- и В-клетки имеют правильную сферическую форму и гладкую поверхность. Ув.х 1250

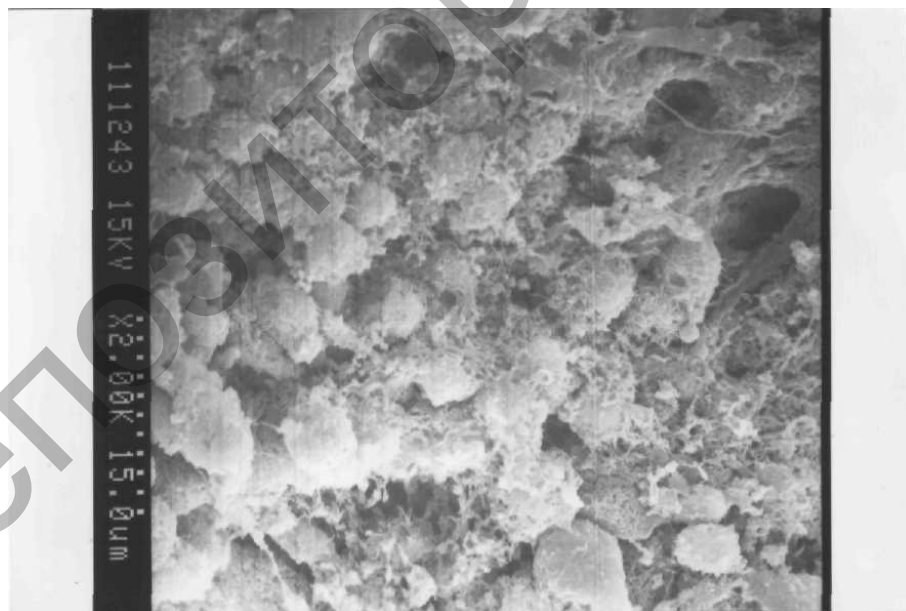


Рис. 2. Сканирующая электронная микроскопия. Панкреатический островок белой крысы + 5 АОХ 263 мкг/мл. Неправильная форма А- и В-клеток, частичное разрушение клеточной мембраны, поверхность клеток теряет гладкость. Ув.х 4640

При световой микроскопии в контрольных препаратах в островках, подвергнутых прямому воздействию 5 АОХ, выявлено разрушение В-клеток и резкое снижение содержания депонированного инсулина в их цитоплазме ($1,04 \pm 0,07$; интактные В-клетки— $1,89 \pm 0,04$) (рис. 3, 4).

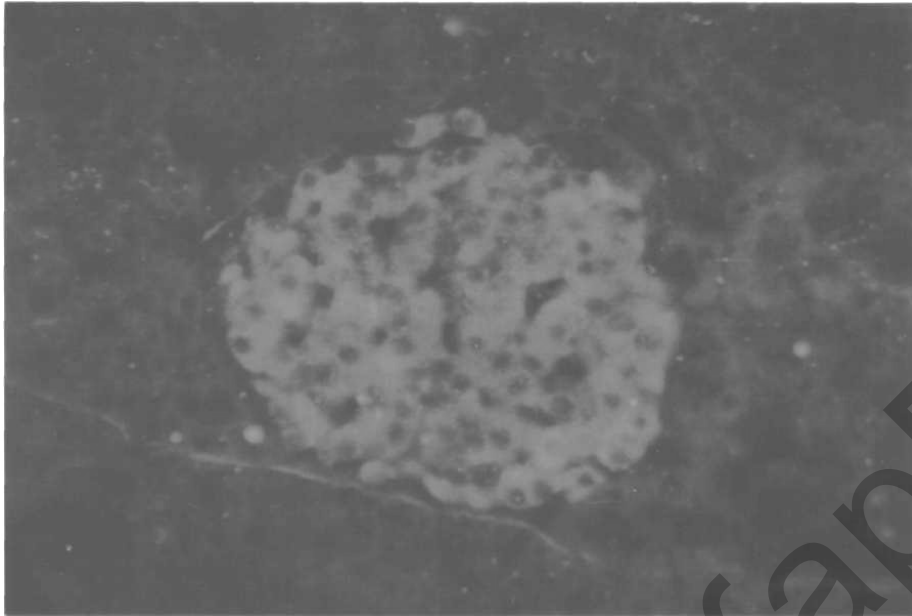


Рис. 3. Панкреатический островок intactной белой крысы. Окраска на инсулин псевдоизоцианином. Интенсивная флюоресценция свидетельствует о достаточном содержании депонированного инсулина в В-клетках. Ув.х120



Рис. 4. Панкреатический островок intactной белой крысы. Окраска на инсулин псевдоизоцианином. Резкое снижение интенсивности содержания депонированного инсулина в В-клетках. Ув.х120

Известно, что парентеральное введение, либо прямое воздействие цинксвязывающих диабетогенных соединений, сопровождается их проникновением в В-клетки с образованием внутрикомплексных солей с ионами цинка [4–12], которые ведут к быстрому разрушению клеток внутри островков. В наших опытах мы воздействовали не изнутри клетки, как это бывает, когда комплекс образуется при попадании диабетогенного вещества внутрь В-клеток, а извне, с помощью синтезированного за пределами клетки токсического соединения. Результаты свидетельствуют о том, что сформированные за пределами клетки комплексы 5 АОХ-Zn также оказывают повреждающее воздействие на клетки независимо в данном случае от их вида.

Результаты трансмиссионной электронной микроскопии панкреатических островков после внутривенного введения 5АОХ: выявлено резкое снижение числа В-гранул в цитоплазме В-клеток — бы-

ло до $12,5 \pm 4$ единиц по сравнению с $44,6 \pm 9$ гранул в интактных В-клетках; количество гранул с низкой электроннооптической плотностью составило 74,8 % по сравнению с 35,6 % в интактных В-клетках (рис.5,6).

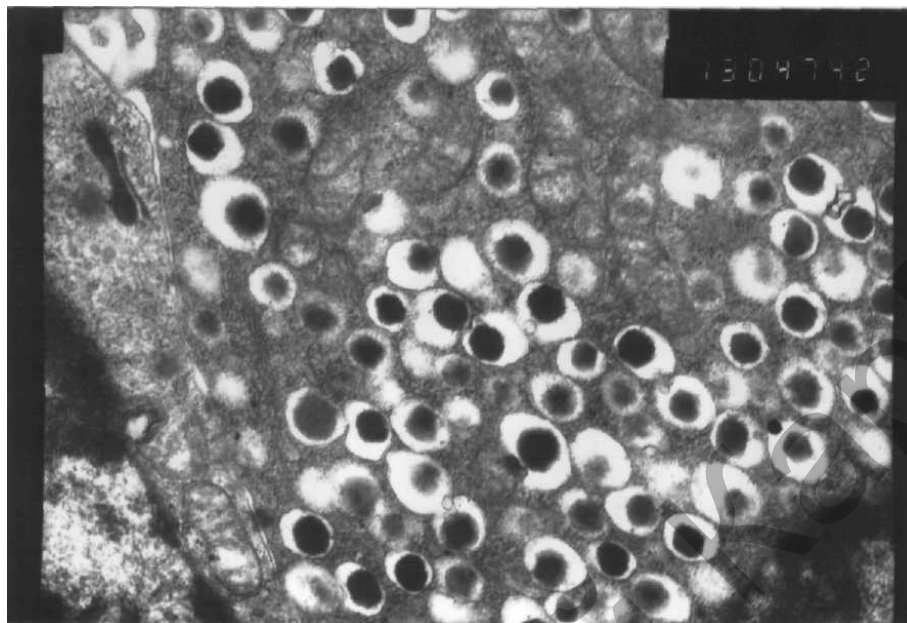


Рис. 5. Трансмиссионная электронная микроскопия. Интактный панкреатический островок. Клеточный матрикс без изменений; обычное содержание В-гранул с высокой электроннооптической плотностью содержимого (депонированный инсулин). Ув.х 6750

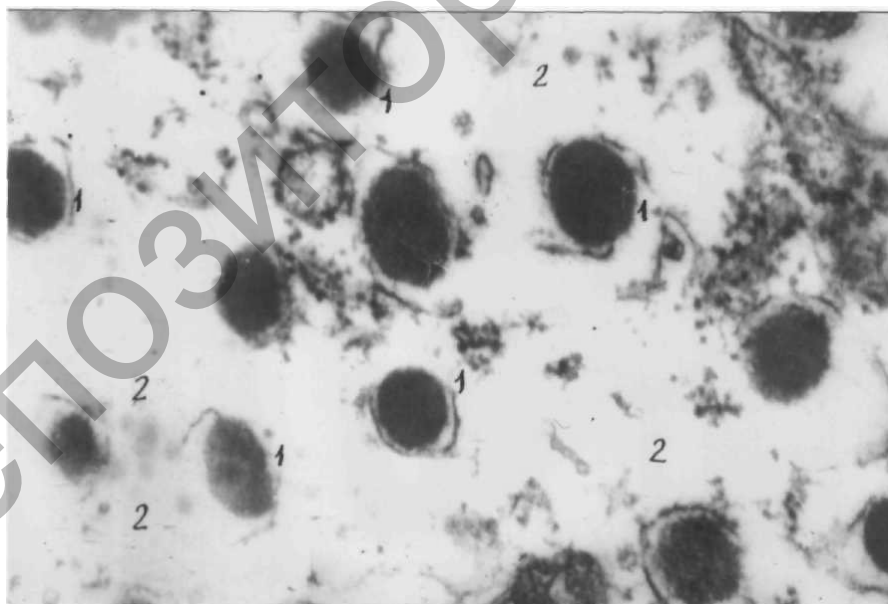


Рис. 6. Трансмиссионная электронная микроскопия. Панкреатический островок после введения 5АОХ. 47.6 мг/кг. Клеточный матрикс разрушен. Повреждение и разрушение оболочек В-гранул. Ув. х 11200

Клеточный матрикс местами просветлен; имеется частичное разрушение нитей эндоплазматического ретикулума. Наиболее характерным для действия комплексобразующих соединений является наличие небольших зон опустошения цитоплазмы на месте разрушения нескольких В-гранул. Анализ препаратов, окрашенных на инсулин псевдоизоцианиновым методом, показал следующее: в

72 % В-клетки после введения 5АОХ разрушены; в центральной части островков имеются участки, представляющие собой бесструктурную массу. Содержание инсулина в месте расположения В-клеток при этом резко снижено ($1,12 \pm 0,04$; интактные $-1,93 \pm 0,06$). В островках, подвергнутых извне действию готового комплекса 5 АОХ-Zn, количество поврежденных В-клеток незначительно и составляет 22 %. Это имеет, по-видимому, следующее объяснение: А-клетки, подвергаясь в первую очередь воздействию комплекса, тем самым как бы защищают находящиеся в глубине В-клетки. Чем глубже расположены В-клетки, т.е. чем ближе к центру островка, тем труднее проникнуть и достичь их комплексу 5АОХ-Zn извне. В случае же, если 5АОХ вводился внутривенно, гибель большинства В-клеток также нетрудно объяснить: проникая с кровью в В-клетки, 5АОХ в их цитоплазме, т.е. на месте, формирует комплекс с цинком, которому не надо на пути из питательной среды преодолевать препятствия в виде как самой жидкой фазы, так и несколько слоев клеток и который тут же оказывает повреждающее воздействие на структуры В-клетки. Кроме того, 5АОХ, связавшись с цинком, добавленным в жидкую фазу вне В-клеток, не может, будучи перехваченным этим цинком, проникнуть в В-клетки, чтобы, связавшись в них уже с островковым цинком, вызвать их разрушение. Результаты опытов также свидетельствуют о том, что токсичный комплекс 5АОХ-Zn вызывает повреждение и разрушение не только В-клеток. Между тем очевидным является тот факт, что внутриклеточное формирование хелатов с ионами цинка в В-клетках оказывает гораздо более выраженное разрушающее влияние на них, вызывая быструю гибель большинства клеток, тогда как при воздействии извне комплекса, сформированного за пределами клетки, по данным сканирующей электронной микроскопии лишь часть А-клеток подвергается разрушению.

Выводы

1. Воздействие на изолированные панкреатические островки искусственно сформированного комплекса 5АОХ-Zn сопровождается изменением формы и состояния поверхности А-клеток в сочетании с гибелью незначительного числа клеток; одновременно наблюдается развитие деструктивных изменений со стороны 22,6 % от общего числа В-клеток.

2. Воздействие 5 АОХ после внутривенного введения сопровождается развитием выраженных деструктивных изменений со стороны 72 % В-клеток; при этом каких-либо изменений со стороны А-клеток не наблюдается. Разрушение большинства В-клеток при воздействии 5-АОХ по сравнению с действием на них готового комплекса 5 АОХ-Zn обусловлено проникновением его в В-клетки и разрушением их изнутри образовавшимся комплексом 5 АОХ-Zn, тогда как комплекс, образовавшийся за пределами островка, оказывает относительно незначительное повреждающее влияние.

Список литературы

1. Murakami E. // J.Biochem. — 1968. — 63. — P. 573–577.
2. Kotake Y., Ueda T. // Acta Vitaminol. Enzymol. — 1975. — 29. — P. 236–241.
3. Weitzel G., Budecke E. // Hoppe-Seyler's Z.Physiol. — 1954. — Bd. 298. — P. 169–184.
4. Лазарис Я.А., Мейрамов Г.Г. // Пробл. эндокринологии. — 1974. — № 5. — С. 90–94.
5. Мейрамов Г.Г., Труханов Н.И. // Пробл. эндокринологии. — 1975. — № 6. — С. 92–95.
6. Meyramov G. G., Meyramova R.G. // Europ. J. of Pharmacol. and Ther. — 1989. — 36. — P. 236.
7. Meyramov G. G., Meyramova J.G. // Akt. Endokrinol. — 1991. — 12. — № 2. — P. 114
8. Meyramov G.G., Meyramova R.G. // Diabetes. — 1991. — Vol. 40. — N6. — P. 65.
9. Meyramov G.G. // «5th World Conf. on Pharmacol. Ther.» — Yokogama, JAPAN. — 1992. — P.284.
10. Meyramov G.G., Akmaev I.G. // «5th World Congress on Pancreas and Islets Transplant». — Miami, USA. — 1995. — P. 109.
11. Meyramov G.G., Mindubaeva F.A., Meyramova A.G. // in b. «20th World Diabetes Congress». — Montreal, CANADA. — 2009. — P. 267.
12. Meyramova A.G., Meyramov G.G. // DIABETES, the Journal of American Diabetes Association, USA. — 2009. — Vol. 58. — N 6. — P. 512.
13. Gomori G. // Amer. J.Pathol. — 1950. — № 20. — P. 665.
14. Coalson R. // Stain Technol. — 1966. — № 2. — P.121–1297.