

УДК 612.349.7—076.4:546.47

З. Е. Бавельский, Н. И. Труханов

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИНКА В ИНСУЛИНОГЕННОЙ ТКАНИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРОЛИКОВ

Поджелудочная железа у многих млекопитающих обладает уникальной способностью накапливать большие количества цинка. После внутривенного введения ^{62}Zn и ^{65}Zn задерживаются в ней, сохраняясь длительное время [5, 18]. Особенно много металла сосредотачивается в панкреатических островках. Со времени опубликования Окамото «цинковой» теории диабета [12] появилось много фактов, свидетельствующих о важной роли цинка в синтезе, секреции и депонировании инсулина. Маске [11] полагал, что цинк необходим для внутриклеточного депонирования инсулина. По мнению Лазарова [9], цинк принимает участие в процессах агрегации гормона. Выявлен определенный параллелизм между содержанием металла в бета-клетках и их функциональным состоянием [17]. Большинство исследований свидетельствуют о том, что основная масса цинка находится в секреторных гранулах бета-клеток, освобождаясь из них одновременно с инсулином [6, 10]. Однако механизм накопления металла и его биохимическая роль в синтезе, секреции и депонировании инсулина до сих пор окончательно не выяснены. Способностью связывать цинк, помимо инсулина, обладает также и проинсулин [14]. Предполагают, что ионы цинка способствуют превращению проинсулина в инсулин, обуславливая выпадение гормона в виде устойчивой кристаллической формы цинк-инсулина [7].

Хотя о визуальном выявлении цинка в панкреатических островках и распределении его в субклеточных структурах есть некоторые сведения [6, 8, 13], их явно недостаточно для ясного представления о взаимосвязи в них цинка и инсулина.

Мы исследовали методами световой и электронной гистохимии распределение цинка в инсулиногенной ткани поджелудочной железы кроликов.

Методика исследований

Опыты проведены на 18 взрослых беспородных кроликах, содержащихся на обычном лабораторном рационе. За сутки до опыта их лишали пищи, не ограничивая воду. Кусочки поджелудочной железы животных, забитых воздушной эмболией, фиксировали в жидкости Буэна. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм окрашивали по Гомори альдегидфуксином. Выявляемая при этом в бета-клетках зернистость соответствует депонированной форме инсулина. Для электронномикроскопического исследования кусочки железы помещали в 2,5% раствор глутаральдегида на фосфатном буфере, дофиксировали в 2% растворе осмиевой кислоты и после обезвоживания заключали в смесь эпон с аралдитом. Срезы толщиной 400 Å получали на ультратоме LKB-4802 А стеклянным ножом; их контрастировали по Рейнольдсу и исследовали в электронном микроскопе УЭМВ-100К. Для выявления в панкреатических островках цинка кроликам внутривенно вводили 50 мг/кг щелочного раствора дитизона и через 10 мин их умерщвляли воздушной эмболией. Криостатные срезы толщиной 10 мкм рассматривали в микроскопе с темнопольным конденсором. Цинк выявляли также предложенным нами методом [3] с помощью нанесения на замороженные срезы железы животных капли 0,01% ацетонового

раствора 8-(п-толуолсульфониламино)хинолина (8ТСАХ), являющегося специфическим для цинка люминесцентным реактивом [1, 3]. Раствор сразу же сливали, срезы отмывали, подсушивали на воздухе до слегка влажного состояния и рассматривали в люминесцентном микроскопе с фильтром УФС-1. Для третьего способа выявления цинка небольшие кусочки железы фиксировали при низкой температуре в 70° спирте, насыщенном сероводородом. Депарафинированные срезы толщиной 7 мкм окрашивали сульфид-серебряным методом Тимма в модификации Фойгта [15, 16], ядра клеток в этих срезах подкрашивали 0,1% раствором метиленовой синьки. Для выявления металла в ультраструктурах бета-клеток кусочки поджелудочной железы фиксировали 3 ч в 2,5% растворе глутаральдегида, насыщенного сероводородом, при температуре +5° С. В течение нескольких часов ткань отмывали в фосфатном буфере с добавлением сахарозы, дофиксировали в растворе осмия и заключали в смесь эпон с аралдитом. Ультратонкие срезы на медных сетках с формваровым покрытием в течение 30 мин выдерживали в капле реактива Тимма при комнатной температуре, в темноте. Сетки тщательно промывали в нескольких порциях бидистиллированной воды и в течение 15 мин контрастировали уранилацетатом.

Результаты исследований и их обсуждение

Панкреатические островки у кроликов многочисленны, компактны, имеют округлую или овальную форму и богато снабжены капиллярами. Бета-клетки занимают центральную часть островка. Цитоплазма их заполнена альдегидфуксиновой зернистостью, располагающейся вдоль клеточной мембраны, больше в полюсе, обращенном к сосуду (рис. 1, А). На электронограммах видно, что капилляры ограничены от островковых клеток двумя базальными мембранами, разделенными светлым пространством. Цитоплазма эндотелиальных клеток содержит множество пор и вакуолей. Бета-клетки, окруженные трехслойной плазматической мембраной, обычно плотно прилегают друг к другу, но в некоторых местах между ними имеются пространства. Ядра клеток сферические или овоидные. Они окружены мембраной, состоящей из двух слоев, разделенных светлым промежутком. У кроликов в окружности ядра всегда обнаруживаются пучки фибриллярных волокон, иногда образующих большие скопления (рис. 2, А). Пластинчатый комплекс располагается вблизи ядра и состоит из трубочек, пластинок, пузырьков и мешочков. Пузырьки комплекса содержат гомогенный материал низкой или умеренной электронной плотности, в то время как трубочки и мешочки обычно электронопроницаемы. Для бета-клеток характерна зернистая цитоплазматическая сеть, цистерны которой неравномерно распределены по цитоплазме и имеют разную электронную плотность. К наружной мембране цистерн прикрепляются рибосомы, количество которых сильно варьирует. Большинство митохондрий в бета-клетках похожи на короткие толстые палочки, встречаются также длинные, волнистые. Митохондриальный матрикс умеренно плотен, кристы ориентированы поперечно. Секреторные гранулы равномерно распределены в цитоплазме. В части клеток они заполняют ее целиком, в других — гранул немного, что является отражением разных стадий секреторного процесса. Гранулы имеют неправильную форму и гомогенно плотный матрикс. Они отделены от гладкой ограничивающей мембраны небольшим пространством неправильной формы и с низкой электронной плотностью.

Введение кроликам дитизона сопровождалось появлением в островках неравномерно рассеянных многочисленных зерен дитизоната цинка, преимущественно в местах расположения бета-клеток (рис. 1, Б). Наиболее густые скопления зернистости часто имели кольцевидную форму, которая, вероятно, соответствовала расположению гранул вокруг сосудов. Границы бета-клеток и их ядра были неразличимы из-за сильного ярко-красного или оранжево-красного свечения гранул. После

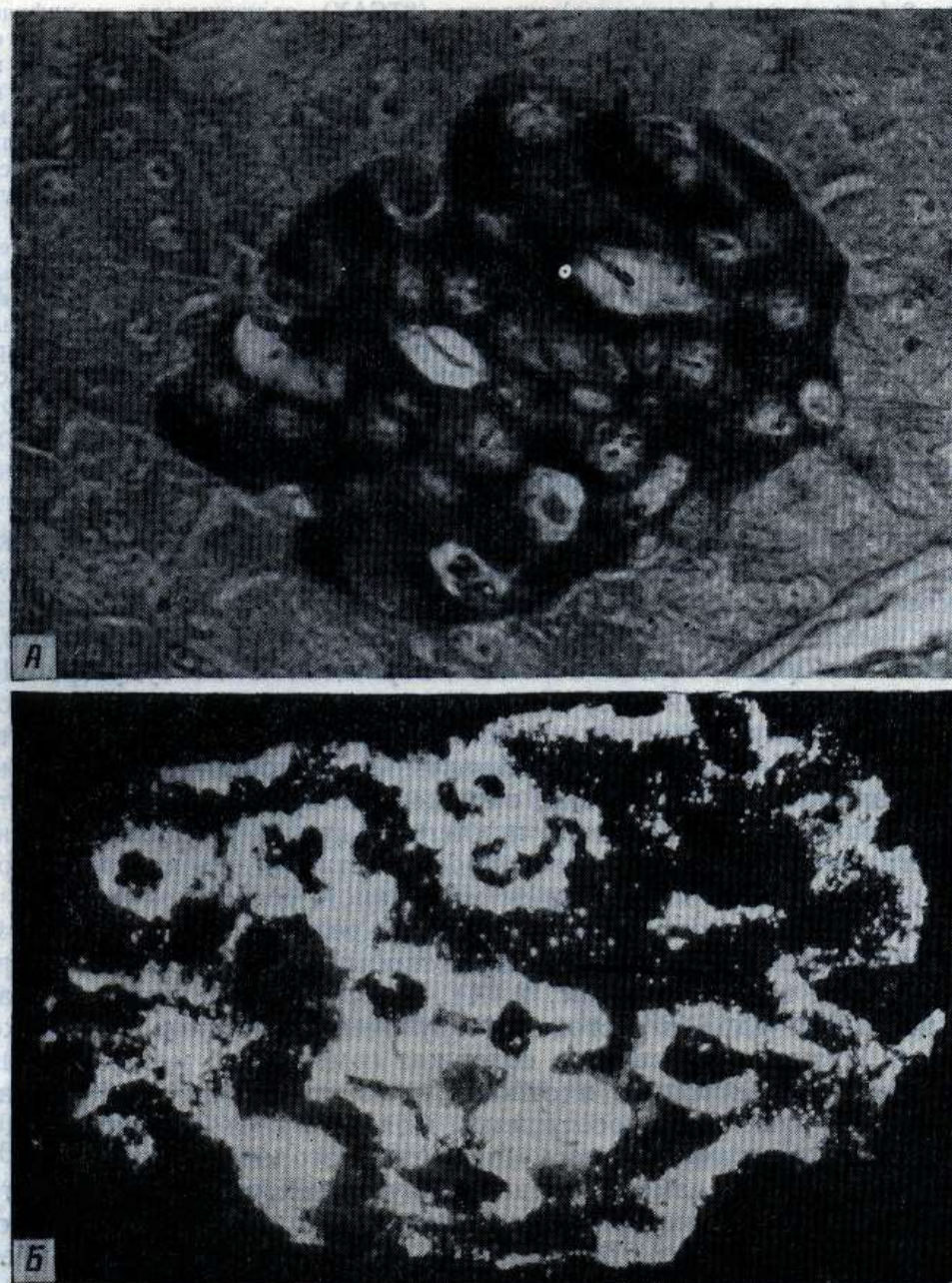
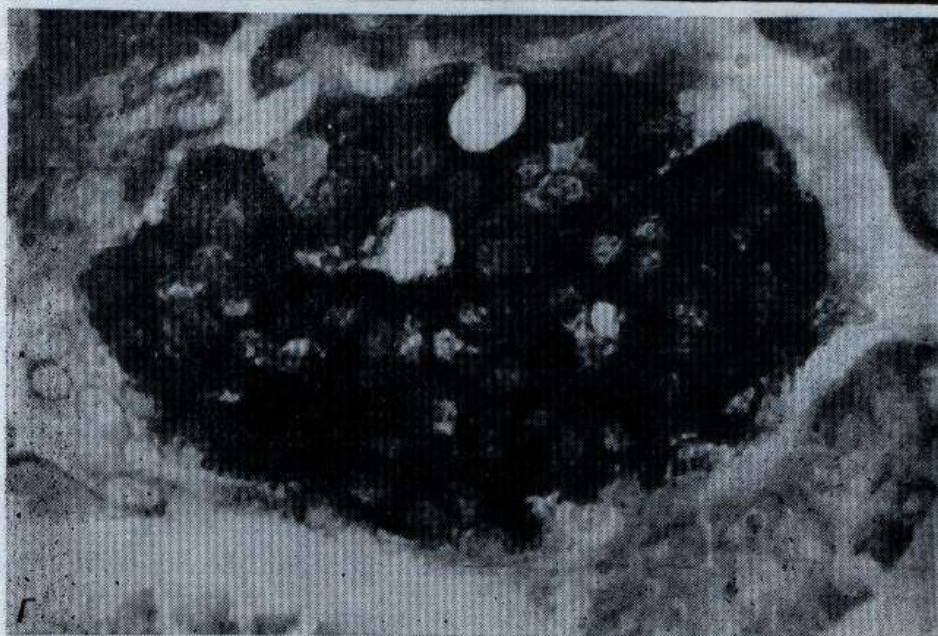
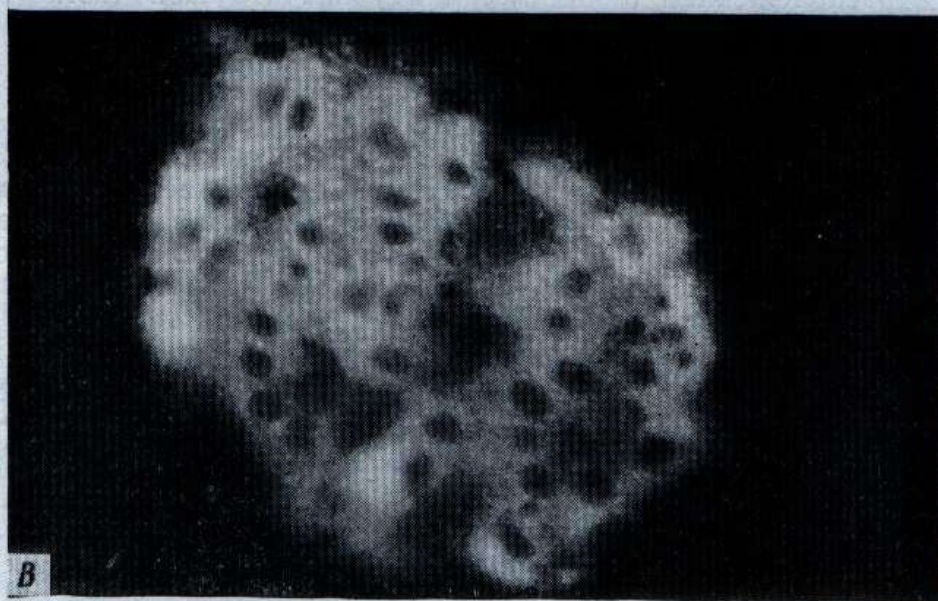


Рис. 1. Гистохимические реакции на инсулин и цинк в

А — бета-клетки заполнены зернистостью, соответствующей депонированной форме инсулина. Альдегидфуксин. $\times 280$. Б — гранулы дитизоната цинка в островке кролика после внутривенного введения дитизиона. Темное поле. $\times 200$.

нанесения на срезы железы специфического реагента на цинк 8ТСАХ на темном фоне экзокринной ткани обнаруживались панкреатические островки, люминесцирующие ярким изумрудно-зеленым светом (рис. 1, В). Ядра островковых клеток при этом почти не светились и выглядели темными.

Обработка срезов железы intactных кроликов сульфидсеребряным способом выявляла в местах расположения бета-клеток множество гранул металла темно-коричневого, почти черного цвета (рис. 1, Г). Гранулы заполняли всю цитоплазму, образуя скопления вдоль клеточной мембраны и в части клетки, обращенной к капилляру.



панкреатических островках здорового кролика.

В — люминесценция бета-клеток после нанесения на срез железы 8ТСАХ. $\times 180$. *Г* — цитоплазма бета-клеток заполнена темными гранулами восстановленного серебра. Сульфидсеребряный метод. $\times 200$.

При небольшом увеличении электронного микроскопа цинк обнаруживался лишь в структурах, депонирующих инсулин, — в гранулах (рис. 2, *Б*). В других частях клетки — ядре, перинуклеарном пространстве, пластинчатом комплексе, цитоплазматической сети и в митохондриях цинка выявить не удалось. В некоторых инсулярных гранулах встречались лишь его следы, в других — сульфидсеребряные зерна заполняли почти все пространство гранулы (рис. 2, *Б* и *Г*). Скопления цинка состояли из округлых зерен разной величины. Положительную сульфидсеребряную реакцию на электронограммах наблюдали почти во всех зрелых инсулиновых гранулах (рис. 2, *Б* и *В*). Наряду с беспоря-

дочным расположением в них металла у значительной части гранул скопления зерен цинка были видны преимущественно по периферии. Одиночные зерна металла обнаруживались также в электроннопроницаемом пространстве, ограничивающем бета-гранулы.

Итак, методами световой и электронной гистохимии нам удалось показать, что в бета-клетках кроликов обнаруживается много металла. Веским доказательством того, что этим металлом является цинк, могут служить опыты с 8ТСАХ, дающим чувствительную гистохимическую реакцию только с цинком и кадмием, из которых последний в поджелудочной железе практически не содержится [2, 4]. Методом электронной гистохимии удалось показать, что выявляемый в бета-клетках цинк сосредоточен преимущественно в секреторных гранулах, которые являются депо инсулина. Установленные нами факты соответствуют немногочисленным данным по этому вопросу [8, 13, 19] и подтверждают представление о важной, но пока не изученной роли цинка в процессе секреции и депонирования инсулина [7, 14].

Литература

1. Божевольнов Е. А., Серебрякова Г. В. 8-п-тозиламинохинолиновый люминесцентный реактив на цинк и кадмий.— В кн.: Химические реактивы и препараты. Госхимиздат, М., 1961, с. 36—42.
2. Войнар А. О., Липская Е. Г., Новосельский Н. В. К вопросу о биогенной роли кадмия.— В кн.: VII Всесоюзный съезд физиологов, биохимиков, фармакологов. М., 1947, с. 579—580.
3. Красавин И. А., Бавельский З. Е., Лазарис Я. А., Дзиомко В. М. Гистохимические реакции на цинк в островках Лангерганса и диабетогенное действие реагентов, используемых для этой цели.— Пробл. эндокрин. 1969, 15, № 3, с. 102—106.
4. Лапин В. И. Содержание микроэлементов в поджелудочной железе и изменение его при диабете: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— Караганда, 1971.— 20 с.
5. Dencler L., Tjalve H. Selective accumulation and retention of zinc in the pancreatic islets.— Acta pharmacol. et toxicol., 1977, 41, Suppl., N 1, p. 156—157.
6. Engelbart K., Kief H. Über das funktionelle Verhalten von Zink und Insulin in den B-Zellen des Rattenpankreas. Virchow's Archiv, 1970, N 4, S. 294—302.
7. Howell S. The molecular organization of the β -granule of the islets of Langerhans.— Advances in Cytopharmacology, 1974, N 2, p. 319—327.
8. Kawanishi H. Electron microscopic studies on the secretory mechanism of pancreatic islet cells with particular reference to beta-cells.— Endocrinol. Japan., 1966, 13, p. 384—408.
9. Lasarow A. Cell types of the islets of Langerhans and the hormones they produce.— Diabetes, 1957, N 6, p. 222—233.
10. Logothetopoulos S., Kaneko M., Wrenshall G., Best C. Zinc, granulation and extractable insulin of islet cells following hyperglycemia or prolonged treatment with insulin.— «The Structure and Metabolism of the Pancreatic Islets.» Stockholm, 1963, p. 333—347.
11. Maske H. Über die Beziehungen zwischen Insulin und Zink in der Langerhansschen Inseln des Pankreas. Experientia, 1955, 11, S. 122—128.
12. Okamoto K. Experimental studies on the pathogenesis of diabetes mellitus.— Folia endocr. Jap., 1949, 25, p. 32—61.
13. Pihl E. An ultrastructural study of the distribution of heavy metals in the pancreatic islets as revealed by the sulfide silver method.— Acta Pathol. et Microbiol. Scand., 1968, 74, N 2, p. 145—160.
14. Steiner D., Kemmler W., Fager A., Peterson S. Proteolytic processing in the biosynthesis of insulin and other proteins.— Fed. Proc., 1974, 33, N 10, p. 2105—2115.
15. Timm F. Zur Histochemie der Schwermetalle. Das Sulfid—Silberverfahren.— Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med., 1958, 46, S. 706—711.
16. Voigt G. Untersuchungen mit der Sulfidsilbermethode an menschlichen und tierischen Bauchspeicheldrüsen.— Virchow's Arch. Path. Anat., 1959, 1332, H. 4, S. 295—323.
17. Wolff H., Ringleb D. Histochemische Untersuchungen über das Inselzink.— Z. ges. exp. Med., 1954, 124, S. 236—256.
18. Yano V., Bubinger T. Cyclotronproduced Zn-62: its possible use in prostate and pancreas scanning as a Zn-62 amino acid chelate.— J. Nucl. Med., 1977, 18, N 8, p. 815—821.

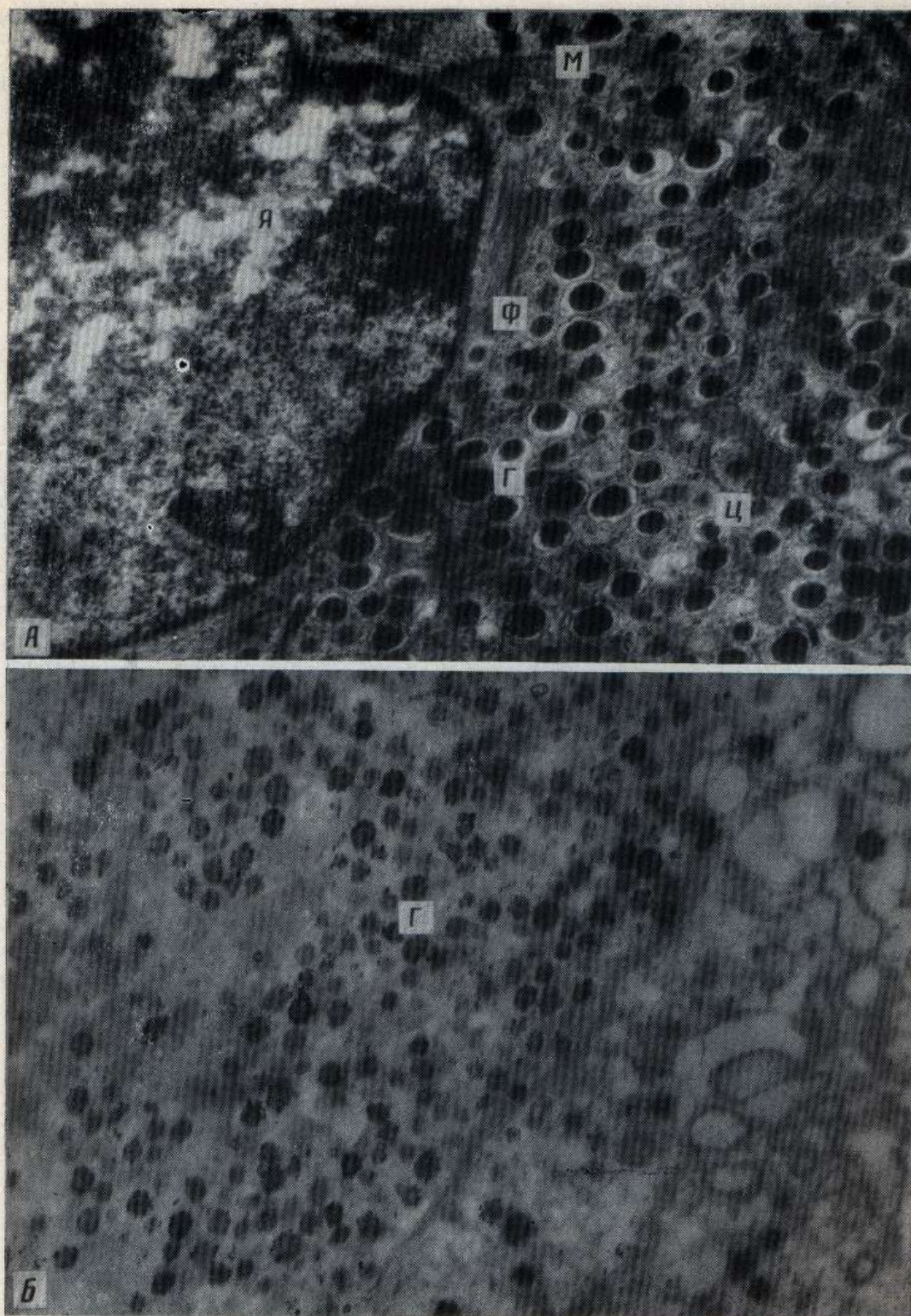


Рис. 2. Электронномикроскопическое выявление цинка в бета-клетках.

А — электронограмма части бета-клетки. Фиксация в глутаральдегиде. Я — ядро, М — митохондрия, Ф — фибриллярная структура, Ц — цитоплазматическая сеть, Г — гранулы. $\times 24\,000$.
 Б — электронограмма части бета-клетки. Фиксация в глутаральдегиде, насыщенном сероводородом. Сульфидсеребрение. Скопления металла видны только в области гранул (Г). $\times 24\,000$.

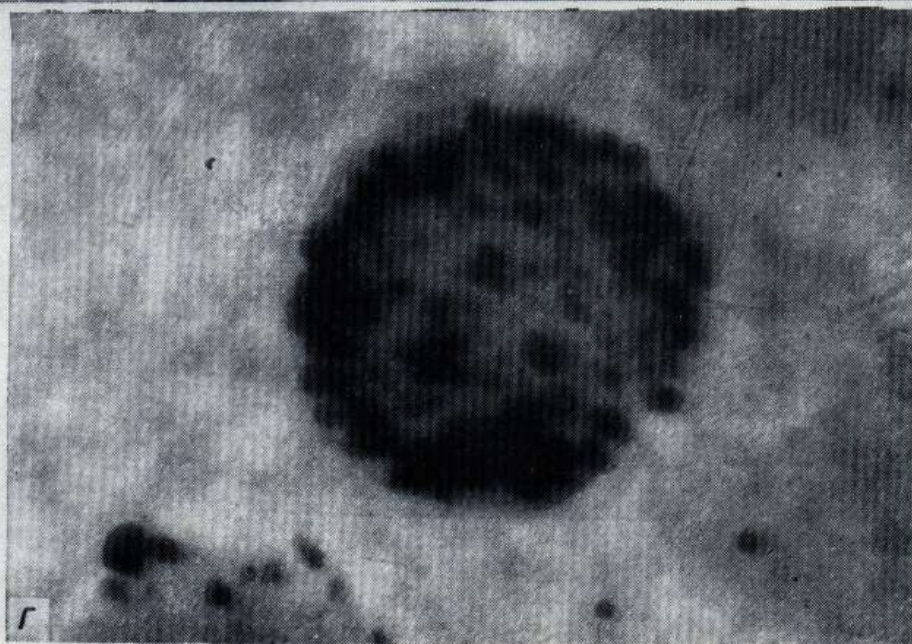
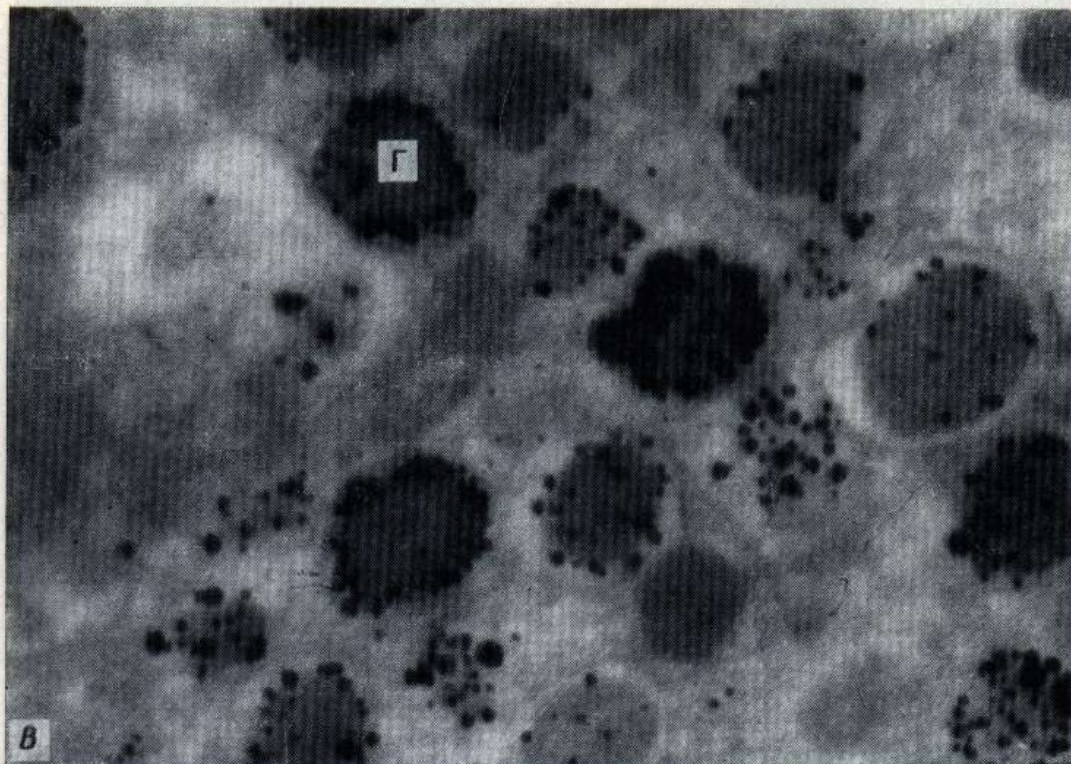


Рис. 2. Электронномикроскопическое выявление цинка в бета-клетках.
 В — электронограмма гранул бета-клетки. Фиксация в глутаральдегиде, насыщенном Сероводородом. Сульфидсеребрение. Зерна металла сосредоточены в бета-гранулах (Г). $\times 130\,000$. Г — электронограмма бета-гранулы, заполненной большим количеством зерен металла. $\times 357\,000$.

19. Yokon S., Aoji O., Matsuno Z., Yoshida H. Electron microscopic histochemistry of heavy metals in islets of langerhans of rabbits.— *Diabetologia*, 1969, 5, N 3, p. 137—142.

Кафедра патологической физиологии и ЦНИЛ
Карагандинского медицинского института

Поступила в редакцию
12.XI 1978 г.

Z. E. Bavel'sky, N. I. Trukhanov

ZINC AND DEPOSITION OF INSULIN IN PANCREATIC β -CELLS

Summary

Light and electron histochemistry methods were used to reveal zinc in insulin-producing tissue of healthy rabbits. Intravenous ditizone administration to rabbits while studying in the dark field was accompanied by appearance of a great deal of zinc ditizonate granules in β -cells. After covering the sections of intact rabbits glands with specific luminescent reagent for zinc (8-(p-tolylsulphanyl amino)quinoline) a bright luminescence was detected. The presence of metal in these cells was investigated under light microscope by sulphide silver method. In electron microscopy of the islet sections treated with sulphide silvering method it was established that zinc in rabbit β -cells is present only in incretory granules which are the accumulation of deposited insulin.

Department of Pathologic Physiology and CSRL
of the Medical Institute, Karaganda