

ЦИТОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПАРАМЕТРЫ ЭНДОКРИННОГО АППАРАТА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ВОЗРАСТНОМ АСПЕКТЕ

Л. А. Можейко

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

Морфологическими, гистохимическими и морфометрическими методами изучалась динамика структурно-метаболических изменений эндокринного отдела поджелудочной железы кроликов в различные периоды онтогенеза. Анализ полученных данных показал, что структурные и гистохимические параметры новорожденных кроликов находятся в стадии роста и дифференцировки, которая завершается с наступлением половой зрелости. Установлено, что значительное увеличение эндокринной массы является результатом как гипертрофии, так и гиперплазии эндокринного аппарата поджелудочной железы. Определена корреляция изучаемых параметров не только с онтогенетическими периодами, но и с адаптацией к пищевым факторам.

Ключевые слова: структурно-метаболические изменения, эндокринный аппарат поджелудочной железы, онтогенетический период, гипертрофия.

The dynamics of the structural and metabolic changes of endocrine part of the pancreas was studied by histological, histochemical and morphometrical methods in experimental rabbits during different ontogenetic periods. The assessment of the data obtained has shown that structural and histochemical parameters in newborn rabbits are in the stage of growth and differentiation and generally complete with the beginning of puberty. It has been concluded that the considerable increase of the insular mass is the result both of hypertrophy and hyperplasia of the endocrine part of the pancreatic gland. The correlation of the parameters studied not only with ontogenetic periods but also with the adaptation to nutritional factors has been determined.

Key words: structural metabolic changes, endocrine part of the pancreas, ontogenetic period, hypertrophy.

Развитие любого органа представляет цепь взаимосвязанных процессов. Далеко не каждый этап этой сложной цепи изучен. Особенно это относится к постнатальному периоду развития. Анализ литературных сведений показал, что при исследовании постнатального формирования органов, в том числе поджелудочной железы, недостаточное внимание уделяется взаимосвязи динамики органогенеза с процессом становления специфической функции, не всегда в полной мере используется морфометрическая оценка объектов изучения [1]. В то же время известно, что учитывание этих факторов позволяет значительно обогатить характеристику морфологического материала, поднять возможности его изучения и анализа на качественно новый уровень понимания закономерностей процессов, протекающих в развивающемся организме [2].

В связи с вышеизложенным, целью настоящего исследования явилось изучение становления цитофункционального и морфометрического статуса эндокринного аппарата поджелудочной железы на протяжении постнатального онтогенеза и роли пищевого фактора.

Материал и методы

В эксперименте использованы 120 кроликов обоего пола породы Шиншилла, состоящих из 12 возрастных групп от рождения до 1 года. Сроки исследования согласованы с общепризнанным подразделением возрастных периодов у кроликов, предложенным Западнюком И.П. и соавт. [5]. В соответствии с ним, группы животных были распределены следующим образом:

I. Период молочного кормления: 1. Возраст новорожденный 1-7 дней (1-ая группа – 1 день, 2-ая группа – 7 дней); 2. Возраст подсосный 8-30 дней (3-ья группа – 14 дней, 4-ая группа – 21 день, 5-ая группа – 30 дней).

II. Период неполовозрелый: 3. Возраст неполовозрелый (инфантильный) 31-90 дней (6-ая группа – 60 дней, 7-ая группа – 90 дней); 4. Возраст предслучный (ювенильный) 4-6 мес. (8-ая группа – 4 мес., 9-ая группа – 5 мес., 10-ая группа – 6 мес.).

III. Период репродуктивный: 5. Возраст молодой 7-10 мес. (11-ая группа – 10 мес.) 6. Возраст зрелый 12-30 мес. (12-ая группа – 12 мес.).

Работа с экспериментальными животными проводилась в соответствии с «Правилами проведения

работ с использованием лабораторных животных». В последний день опытного срока с 10⁰⁰ до 11⁰⁰ утра после эвтаназии животных парами эфира брали материал поджелудочной железы для гистологического исследования. Пробы ткани фиксировали в жидком азоте. В криостатных срезах изучали активность ферментов: сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и дегидрогеназы восстановленного никотинамиддинуклеотида (НАДН-ДГ) по Нахласу и соавт., лактатдегидрогеназы (ЛДГ) по Гесс и соавт., кислой фосфатазы (КФ) по Гомори. Этот же материал обрабатывали для выявления фосфолипидов по Беккеру. Парафиновые срезы после предварительной фиксации в жидкостях Карнуа, Буэна и ацетоне окрашивали гематоксилином и эозином; для выявления активности щелочной фосфатазы (ЩФ) обрабатывали по методу Гомори, для выявления РНК – по методу Браше для идентификации А и В клеток островкового аппарата – паральдегид-фуксином и смесью Хэлми [13].

Стандартные условия проведения реакций в сравниваемых объектах достигались монтированием проб ткани опытных и контрольных животных одним блоком. Для количественной оценки островковой ткани на серийных гистологических срезах изучались следующие показатели:

1) количество островков на единицу поверхности (10 мм²); 2) площадь островковой ткани (абс., мкм²) – определялась с помощью морфометрической сетки; 3) соотношение эндокринной, экзокринной паренхимы и стромы (%); 4) общее количество клеток в островках (не менее 1000 у одного животного) и среди них В и А клеток; 5) общее количество клеток в одном «среднем» островке; 6) процентное соотношение островков с различным количеством клеток. Для его составления проводили разбивку на классы: I – 5-16 клеток, II – 16-30 клеток, III – 31-60 клеток, IV – 61-100, V – более 100 клеток [4].

Производили визуальную количественную оценку изучаемых веществ на гистологических препаратах, а также цитофотометрию на микроабсорбциометр-флюориметре для тонкослойной хроматографии, адаптированного для изучения биологических объектов МФТХ-2М (ЛОМО, Россия). Активность всех изучаемых ферментов представлена в единицах оптической плотности. Полученный цифровой материал обрабатывался по общепринятым критериям вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента [1].

Результаты и обсуждение

Результаты цитофизиологических и морфомет-

рических исследований позволили установить, что с возрастом, а также изменением типа питания структура инсулярного аппарата претерпевает существенную перестройку. Изменяются количество, размер, клеточный состав и кровоснабжение островков.

Известно, что к моменту рождения эндокринные островки являются уже действующей эндокринной железой, но несмотря на сформированность общей конструкции островков, отдельные компоненты их находятся в стадии роста и дифференцировки. Сформировавшиеся островки обычно локализованы внутри долек и окружены базальной мембраной. Островки с отсутствием четких границ и не утратившие связь с выводной системой чаще встречаются в прослойках междольковой соединительной ткани, которые довольно широки, ацинусы экзокринной паренхимы располагаются рыхло. Отмечается обилие кровеносных капилляров, как правило, кровенаполненных. Соотношение стромы, эндокринной и экзокринной паренхимы свидетельствует об относительно значительной доле стромы (табл. 1). Распределение островков по размерным классам показывает, что количество малых островков является преобладающим. Островки большого размера (более 100 клеток) у новорожденных практически не встречаются (табл. 1).

Основным типом островков новорожденных кроликов является «плащевой». Как и у человека, выделяются две зоны: гемоцеллюлярная (центральная) и гетероцеллюлярная (периферическая). Гемоцеллюлярная зона состоит преимущественно из В-клеток, в гетероцеллюлярной – преобладают А-клетки. А- и В-эндокриноциты по характеру внутриклеточной организации достаточно дифференцированы, хотя в составе островков можно найти и дифференцирующиеся клетки с крупными ядрами, не достигшие окончательного развития. Встречаются также В-клетки с фигурами митоза. Гистохимически островковая ткань отличается от ацинарной. Существенны различия и между двумя главными типами клеток эндокринных островков – А- и В-клетками. В-клетки обладают специфической альдегид-фуксинофильной зернистостью. Соответственно количеству и расположению гранул в В-клетках выделяют 4 основных типа эндокринных островков: 1. гипергранулированные, в которых почти все клетки равномерно заполнены гранулами; 2. перикапиллярно-гранулированные, в которых гранулы занимают апикальную часть клетки, прилежащую к капилляру; 3. дегранули-

Таблица 1. Возрастные изменения морфометрических показателей поджелудочной железы (M±m)

Возраст животного	Площадь паренхимы		Площадь стромы, %	Классы островков, %				
	экзокринной, %	эндокринной, %		I	II	III	IV	V
Новорожденный	66,9±0,9	3,4±0,3	29,7±0,2	27,3±0,3	30,1±0,6	26,0±0,3	16,4±0,3	-
7 суток	77,8±0,7*	4,6±0,4*	18,2±0,7*	32,5±0,8*	29,2±0,4	24,1±0,4*	14,0±0,2*	-
14 суток	77,5±1,1*	4,7±0,6	17,8±0,5*	29,3±0,6*	30,4±0,7	24,9±0,5	15,2±0,4	-
21 суток	77,3±1,0*	5,6±0,5*	17,1±1,0*	24,0±0,4*	28,6±0,4	27,3±0,3*	17,1±0,3*	2,8±0,05*
30 суток	78,7±0,9*	6,0±0,7*	16,1±0,8*	20,4±0,5*	25,3±0,4*	30,0±0,6*	18,2±0,6*	6,0±0,09*
60 суток	80,3±1,3*	4,0±0,4	15,7±0,4*	19,5±0,2*	23,2±0,3*	30,4±0,9*	19,3±0,3*	7,4±0,2*
90 суток	81,6±0,8*	3,4±0,4	15,0±0,6*	18,2±0,4*	22,6±0,3*	31,1±0,8*	19,0±0,5*	8,8±0,2*
120 суток	82,7±1,4*	2,4±0,3*	14,9±0,3*	16,9±0,3*	21,3±0,5*	30,5±0,6*	20,3±0,3*	10,7±0,1*
360 суток	82,7±1,2*	2,1±0,5*	15,2±0,4*	16,5±0,2*	20,1±0,4*	29,7±0,3*	20,8±0,4*	11,6±0,3*

Примечание: * - различия показателей достоверны по сравнению с исходным уровнем у новорожденных (P < 0,05)

рованные – с минимальным количеством гранул, группирующихся главным образом вокруг ядер В-клеток; 4. неравномерно - гранулированные, в которых одни В-клетки заполнены гранулами, другие В-клетки почти полностью их лишены [4]. В поджелудочной железе обычно можно наблюдать все 4 типа островков, но подсчет островков различного типа способствует иллюстрации секреторного цикла железы. У новорожденных кроликов заметно преимущество островков 1-го типа, что отражает фазу накопления и депонирования секрета. В-клетки обеспечиваются энергией для секреции и выделения инсулина через обмен глюкозы. Изучаемые ферменты представляют различные пути ее метаболизма- аэробного и анаэробного (гликолитического). ЛДГ – ключевой показатель гликолитического пути, НАДН-ДГ и СДГ- ферменты гексозофосфатного пути и цикла Кребса. Выявлена разная степень активности этих ферментов в В-эндокриноцитах, но она всегда ниже, чем в экзокринном эпителии (рис. 1). По сравнению с другими животными и человеком, где активность ЛДГ в островках в 10 раз меньше ацинарной, а малатдегидрогеназная в 70 раз превышает лактатдегидрогеназную активность островков, у кроликов такой разницы не наблюдается. Возможно, формирование молочной кислоты для кроликов играет более важную роль [3, 10]. В отличие от дегидрогеназ активность кислой фосфатазы в островках выше, чем в ацинарной ткани. Согласно A.G.E.Pearse и др. [8, 13] ее определение может употребляться в качестве функционального индикатора В-клеток. Фермент диффузно распределен по цитоплазме В-клеток с максимальной концентрацией в перинуклеарной зоне. Некоторые авторы считают, что довольно значительная кислофосфатазная активность у новорожденных и молодых животных может быть выражением созревания и

быстрой пролиферации островковых клеток, наблюдающейся в ранней стадии жизни [11]. Выявлено, что В-клетки не обладают сколько-нибудь заметной активностью щелочной фосфатазы. По литературным данным, последняя является преобладающим ферментом А-клеток островков приматов и других животных. Предполагается, что ЩФ принимает участие в транспорте ионов и молекул для синтеза глюкагона. Однако у кроликов нам не удалось обнаружить активность ЩФ в А-клетках, что подтверждается исследованиями и других авторов [14]. Трудно сказать, являются ли наблюдаемые отличия результатом вариаций оптимальных условий активности ферментов у разных видов или более основательных биохимических отличий. Кроме того, в В-клетках, в отличие от А-клеток, обнаружено умеренное количество РНК и фосфолипидов.

Наиболее интенсивные морфологические преобразования в эндокринном аппарате поджелудочной железы наблюдаются в первые же недели после рождения, что связано, по всей видимости, с адаптацией к новым условиям существования и началом принятия пищи.

У 7-суточных кроликов эндокринные островки уже редко встречаются в междольковой соединительной ткани, а локализованы внутри долек. Процентное содержание соединительнотканной стромы относительно железистой паренхимы неуклонно снижается. Ускоренными темпами нарастает общая площадь эндокринной ткани (табл. 1). Морфометрический анализ свидетельствует, что это происходит, в основном, за счет увеличения количества островков на единицу поверхности (по сравнению с новорожденными животными на 18,8%; P<0,05). При этом доля мелких островков превышает 60%. Гипертрофии островков не наблюдается. Отмечаемая гиперплазия – количественное уве-

личение популяции островков через неогенез, т.е. формирование новых анатомо-функциональных единиц, осуществляется, очевидно, из эпителия выводных протоков и centroacinosных клеток, что впервые экспериментально доказано Dudek. R.W и соавторами [9]. Продолжается гистохимическая дифференцировка В и А- эндокриноцитов. В В- клетках уменьшается количество альдегид- фуксифильной зернистости, являющейся эквивалентом депонированной формы инсулина. В соответствии с классификацией эндокринных островков по степени бета- гранулированности обнаруживается увеличение количества островков так называемого перикапиллярно-гранулированного типа. В-инсулоциты таких островков частично дегранулированы, около 75% альдегидфуксифильных гранул, находящихся в цитоплазме, смещены к капиллярному полюсу клеток, что отражает фазу выделения секрета. Параллельно усиливается активность ферментов клеточного метаболизма – СДГ, НАДН-ДГ, ЛДГ. Заметно увеличивается кислородная активность (рис. 1). Экспериментальные данные указывают, что при изменении функциональных требований к В- клеткам лизосомы также вовлекаются в процесс адаптации и активность КФ может быть показателем функционального состояния этих клеток [7, 12]. Одновременное нарастание количества РНК, по-видимому, является результатом усиления синтеза ферментов. Остаются расширенными и кровенаполненными кровеносные капилляры островков. Активность их транспортного фермента - щелочной фосфатазы - повышена.

У 2-х недельных кроликов нарастание эндокринной паренхимы продолжается. Отмечается укрупнение островков, которое становится более заметным к 3-4-х недельному сроку развития. В этот возрастной период особенно выражена обратная корреляционная связь между эндокринной и экзокринной паренхимой (табл. 1). Общее количество эндокриноцитов в одном среднем островке возрастает на 12,1% ($P < 0,05$). В цитологическом составе инсулоцитов показателем гиперпластического процесса с вовлечением почти исключительно В-клеточного компонента. Как известно, длительность клеточного цикла В-клеток составляет около 15 часов [11]. Вероятно, масса В-клеток адаптируется к изменениям в периферической потреб-

ности в инсулине. Гистохимические параметры В-инсулоцитов свидетельствуют в пользу усиления секреторной активности.

При переходе к смешанному, а затем дефинитивному типу питания отмечается определенная гетерогенность клеточного метаболизма эндокринных островков. Наряду с перикапиллярно - гранулированными встречаются неравномерно - гранулированные островки, в которых одни В-клетки заполнены гранулами, другие - почти полностью лишены их. При этом активность НАДН-ДГ увеличивается более чем на 20% по сравнению с исходной, а кислородная и лактатдегидрогеназная - более, чем на 30% ($P < 0,05$). Поскольку альдегидфуксифильная зернистость считается эквивалентом депонированной формы инсулина, уменьшение ее количества может свидетельствовать об усилении выделения инсулина. С завершением неполовозрелого периода развития новообразование островков стихает, интенсивность роста эндокринной паренхимы снижается, хотя укрупнение островков продолжается. Среди общей инсулярной популяции происходит относительное увеличение островков III – V размерных классов (табл. 1). Активность изучаемых ферментных систем и РНК изменяется незначительно.

С наступлением периода полового созревания процессы пролиферации эндокринного эпителия замедляются. Соотношение железистой паренхимы и соединительнотканной стромы, а также экзокринной и эндокринной паренхимы стабилизируется (табл. 1). К 10-12 месяцам постнатального

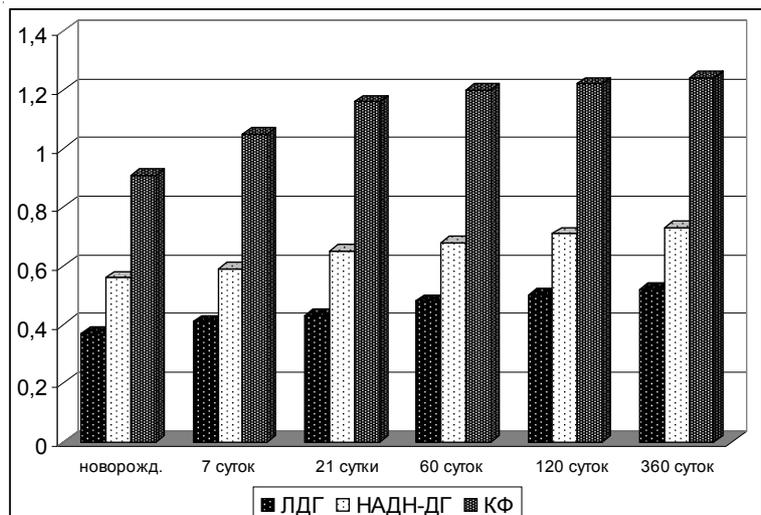


Рис. 1. Активность ЛДГ, НАДН-ДГ и КФ в В-эндокриноцитах поджелудочной железы кроликов различного возраста (ед. оп. пл.)

Примечание: * - различия показателей достоверны по сравнению с исходным уровнем у новорожденных ($p < 0,05$)

онтогенеза структурно-метаболическая характеристика эндокринного аппарата поджелудочной железы полностью соответствует дефинитивному состоянию.

Вышеизложенное позволяет сделать следующее заключение. К моменту рождения эндокринный аппарат поджелудочной железы еще отличается незрелостью, незавершенностью своей структурной и метаболической организации. Данные, полученные на светооптическом уровне как количественными методами исследования, так и путем качественного анализа свидетельствуют о том, что наиболее быстрыми темпами морфологическая и гистохимическая дифференцировка происходит в первые же недели после рождения кроликов. Островковые элементы значительно раньше, чем экзокринная ткань железы завершают свое функциональное становление. Выявлено, что для состояния их дальнейшего метаболического потенциала важно значение алиментарного фактора. Расположение и морфометрические параметры островков - количество, размер, клеточный состав - претерпевают наиболее сложную трансформацию. Установлено, что до периода полового созревания масса эндокринной ткани существенно нарастает. Причем, сначала это происходит за счет подъема количества островков на единицу поверхности, особенно возрастает доля мелких островков, а затем преобладает процесс гипертрофии островков, в них увеличивается содержание В- клеток. Изменения организации эндокринных островков на различных этапах постнатального онтогенеза могут расцениваться как адаптивные в соответствии с меняющимися условиями существования и питания, когда происходит совершенствование существующих структур для реализации возможности полноценного функционирования органа в качественно новых условиях. Изучение онтогенетических механизмов становления эндокринных островков - одного из звеньев эндокринной системы - имеет общебиологическое значение, так как дополняет имеющиеся сведения об ее уникальных свойствах.

Литература

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. - М.: Медицина, 1990. - 384с.
2. Артишевский А.А., Гайдук В.С., Кравцова И.Л. Закономерности

становления эндокринных желез в эмбриогенезе человека и млекопитающих и их реакция на стрессорные воздействия //В кн.: Функциональная нейроморфология. Фундаментальные и прикладные исследования. - Мн.: Бизнесофсет, 2001. - С. 232-235.

3. Гидранович В.И. Метаболическая активность гликолиза, пентозофосфатного пути и цикла трикарбоновых кислот в эндокринной системе крупного рогатого скота. - Тез. докл. VII съезда БФО. - Витебск. - 1987. - С. 47-48.
4. Донов С., Христова Т., Зафирова М. Степени различия бета-гранулярности островков Лангерганса крысы //Мед. - биол. пробл. - 1978. - №6. - С. 21-31.
5. Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А. Лабораторные животные. - М.: Медицина, 1983. - Изд.3. - С. 21-26.
6. Леонтьев А.С. Проблемы количественной морфологии развивающегося организма. В сб.: Количественная морфология развивающегося организма. - Мн.: МГМИ, 1998. - С. 5-8.
7. Торощев И.В., Ещенко В.А. Некоторые закономерности распределения цинка, инсулина и кислой фосфатазы в островках Лангерганса кроликов в динамике развития диабета, получаемого избирательным повреждением клеток В //Архив патологии. - 1971. - N3. - С. 43-49.
8. Chatterjee A.K., Mukherjee S.K. Acid phosphatase activity as an index of pancreatic beta-cell function // Indian J. Exp. Biol. - 1981. - V.19. - P. 228 - 230.
9. Dudek R.W., Lawrence J.E., Hill R.S., Johnson R.C. Induction of islet cytodifferentiation by fetal mesenchyme in adult pancreatic epithelium // Diabetes. - 1991. - №8. - P. 1041 - 1048.
10. Gepts W., Gregoire F., Assche A., Gasparo M. Quantitative enzyme pattern and insulin content of human islets of Langerhans // In: The structure and metabolism of pancreatic islets. - Oxford: Pergamon Press, 1970. - P. 283 - 303.
11. Hellerström C., Swenne J. Growth pattern of pancreatic islets in animals // Diabetic Pancreas. - New York, London. - 1985. - P. 53-79.
12. Landström A.H., Westman J., Niskanen L.A. Lysosomes and pancreatic islet function time course of insulin biosynthesis, insulin secretion, and lysosomal transformation after rapid changes in glucose concentration // Diabetes. - 1988. - V 37. - №3. - P. 309 - 316.
13. Pearse A.E. Histochemistry. Theoretical and Applied. - London: Churchill, 1968. - 962p.
14. Petkova D.E. Comparative histochemical studies of mammalian pancreatic islets // In: The structure and metabolism of pancreatic islets. - Oxford: Pergamon Press, 1970. - P. 213 - 222.

Resume

CYTOFUNCTIONAL PARAMETERS OF ENDOCRINE PART OF THE PANCREAS WITH REGARD TO AGE

Mozheyko L.A.

Grodno State Medical University

We have studied the dynamics of morphofunctional changes of the endocrine part of the pancreas with regard to age. We have found that statistically significant changes which indicate a considerable increase of the islet mass develop. This anatomic modification is the result both of hypertrophy and hyperplasia of the endocrine part of the pancreatic gland.