

УДК 616.36-008.881.6:612.34]-092.9

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭНДОКРИННОГО АППАРАТА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПОТОМСТВА КРЫС, РОДИВШИХСЯ В УСЛОВИЯХ ХОЛЕСТАЗА

Л.А. Можейко, к.м.н., доцент; А.С. Беленинова

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

В настоящем исследовании гистохимическими и морфометрическими методами изучались структурно-функциональные изменения в эндокринной части поджелудочной железы потомства белых крыс, родившихся от матерей с подпеченочным обтурационным холестазом, вызванным на 17 день беременности. Анализ полученных данных показал уменьшение общей площади эндокринных островков и дегрануляцию В-клеток в ранний период (15 дней) постнатального развития потомства.

Ключевые слова: поджелудочная железа, эндокринные островки, обтурационный холестаз, потомство.

In the present investigation the structure-functional changes of the endocrine pancreas have been studied by histochemical and morphometrical methods on albino rat pups which were born under conditions of subhepatic obturational cholestasis induced in their mothers on the 17th day of pregnancy. The analysis of the obtained data has shown the decrease of the total surface of endocrine islets and degranulation of the B-cells during the early stage of postnatal development of the posterity (aged 15 days).

Key words: pancreas, endocrine islets, obturational cholestasis, posterity.

Введение

Актуальность работы обусловлена двумя обстоятельствами. Первое – прогрессирующие увеличение числа беременных женщин с заболеваниями панкреатогастродуоденальной зоны, внепеченочных желчных протоков, которые сопровождаются развитием механической желтухи [2, 10]. К тому же если раньше, например, конкременты в желчном пузыре, являющиеся причиной заболевания, нередко оставались нераспознанными, то в настоящее время в связи с широким распространением ультразвукового исследования (сонографии) они стали выявляться все чаще и чаще. При беременности, осложненной застоем желчи, синтез желчных кислот обычно снижается и наблюдается задержка желчных кислот, билирубина и холестерина в сыворотке крови [17]. При этом установлено достоверное снижение трансплацентарного транспорта желчных кислот за счет снижения сродства переносчиков к желчным кислотам в клетках трофобласта плаценты. Второе обстоятельство – это совершенно недостаточное изучение последствий такого состояния для здоровья матери и потомства. В клинических условиях отмечено, что у детей может наблюдаться желтуха новорожденных и задержка в развитии умственных и моторных функций, предрасположенность к инфекционным заболеваниям, нарушение восстановления иммунной и эндокринной систем [6]. В эксперименте установлено недоразвитие некоторых отделов мозга, печени, надпочечников, селезенки [1, 3], изменение структурных параметров количественных показателей желудка, почек, яичников [8, 9]. Однако ни в отечественной, ни в зарубежной литературе нам не удалось найти морфологических данных о влиянии холестаза на становление поджелудочной железы потомства и, в частности, ее эндокринного аппарата, хотя сведения о взаимосвязи секреции желчи и эндокринного аппарата поджелудочной железы имеются. Так, еще в 1939 году R.Leriche и A.Joung [14, 15] заметили у собак при отведении желчи в мочевой пузырь снижение концентрации плазменной глюкозы и уменьшение гликемического ответа на в/в введение глюкозы. Эти же авторы наблюдали женщину с тяжелым диабетом, у которой гипергликемия и глюкозурия значи-

тельно уменьшались после полного наружного отведения желчи. Информация N.McIntyre с соавт. [15] и J.Dupre, Y.Beck [12] о том, что оральное введение глюкозы вызывает более раннее и значительное выделение инсулина, чем в/в, позволило выдвинуть предложение о функциональной связи между кишечником и эндокринной частью поджелудочной железы. Однако пути, с помощью которых осуществляются связи, получившие название «энтероинсулярной оси», не ясны и продолжают обсуждаться [16]. Согласно современным данным, в метаболизме глюкозы активное участие принимают желчные кислоты [11].

В связи с изложенным целью настоящей работы: изучить влияние экспериментального обтурационного подпеченочного холестаза, вызванного на 17 день беременности самок, на становление эндокринного аппарата поджелудочной железы на 15 сутки родившихся от них крысят.

Материал и методы

Эксперименты проведены на беспородных половозрелых белых крысах-самках массой 165-180 г, находящихся на пике репродуктивной активности, и родившихся от них крысятах. Половозрелые крысы помещались в клетки для спаривания из расчета 1 самец – 3 самки. Первым днем беременности считали обнаружение во влагалищных мазках спермиев. Из покрытых самок сформировали 2 группы: опытную и контрольную. Опытную группу составляли 13 самок, которым на 17 сутки беременности, т.е. в период активного фетогенеза, моделировали холестаз путем наложения на общий желчный проток на 3-5 мм ниже места слияния долевых протоков печени двух лигатур с последующей перерезкой между ними желчного протока [5]. Контрольным крысам (7 крыс) производили все те же манипуляции, но без наложения лигатуры на общий желчный проток. При этом в течение всего эксперимента у контрольных животных сохранялся физиологический отток желчи. За самками и родившимися от них крысятами велось тщательное наблюдение.

На 15-е сутки развития (ранний постнатальный период) родившихся животных (10 контрольных и 12 опытных крысят) подвергали декапитации под глубоким эфирным

наркозом в утренние часы. Быстро извлекали поджелудочную железу и иссекали кусочки для исследования. Взятый материал после фиксации в жидкости Карнуа и Буэна заключали в парафин. Изготовленные серийные срезы от контрольных и опытных крысят толщиной 5 мкм помещали на одно стекло и окрашивали для морфологических исследований гематоксилином и эозином. Для выявления эндокринных островков использовали метод окраски альдегид-фуксином по Гомори [7].

Морфометрические исследования островков эндокринной части поджелудочной железы проводили при помощи системы компьютерного анализатора изображения Image-Warp (Беларусь-США) при увеличении микроскопа Axioscop 2plus (Carl Zeiss Jena, Германия) в 10 и 40 раз. Определяли: 1) площадь островковой ткани; 2) количество островков на единицу площади среза; 3) соотношение эндокринной и экзокринной паренхимы; 4) общее количество клеток в островках; 5) среднее количество клеток в одном островке; 6) процентное соотношение островков с различным количеством клеток. Полученные цифровые данные обрабатывали методами непараметрической статистики, используя t-критерий Стьюдента с помощью лицензионной компьютерной программы Statistica 6,0 для Windows (Stat Soft. inc., США). Различия между группами считали статистически значимыми, если вероятность ошибочной оценки не превышала 5% ($p < 0,05$).

Иллюстрированный материал готовили, используя микроскоп Axioscop 2plus (Carl Zeiss, Германия) с цифровой видеокамерой Leica DFC 320.

Результаты и их обсуждение

Установлено, что после рождения эндокринный аппарат поджелудочной железы крысят является уже активно действующим и островковые элементы значительно раньше, чем экзокринная ткань железы, завершают свое функциональное становление. У 15-суточных контрольных крысят эндокринные островки занимают около 3% всей площади железы, локализованы, как правило, внутри долек и ограничены базальной мембраной. Они имеют преимущественно средние размеры с хорошо развитой сетью широких кровеносных капилляров, диаметр которых значительно превышает диаметр таковых в экзокринной паренхиме, что создает условия для замедления тока крови и более длительного контакта между эндокринными клетками и кровеносным руслом. Преобладающим типом клеток островков Лангерганса, как и у человека, являются инсулиноциты (В-клетки), которые в виде трубчатых структур, окружающих кровеносные капилляры, локализуются в центре островков (гемоцеллюлярная зона), а в периферической зоне (гетероцеллюлярной) располагаются преимущественно глюкагоноциты (А-клетки). Среди инсулиноцитов изредка встречаются клетки с фигурами митотического деления. Результаты исследования свидетельствуют, что к 15-ти суткам развития островковые клетки приобретают достаточную структурную и гистохимическую дифференцировку. В-эндокриноциты легко отличимы по наличию специфической зернистости, обнаруживаемой после окрашивания паральдегид-фуксином и являющейся эквивалентом депонированного инсулина. Выделяется 4 основных типа эндокринных островков соответственно количеству и расположению секреторных гранул в В-клетках [4]: 1 – гипергранулированные, в которых почти все клетки равномерно заполнены гранулами; 2 – перикапиллярногранулированные, в которых гранулы занимают апикальную часть клетки, прилежащую к капилляру; 3 – дегранулированные – с минимальным количеством гранул, груп-

пирующихся главным образом вокруг ядер В-клеток; 4 – неравномерно – гранулированные, в которых одни В-клетки заполнены гранулами, другие В-клетки почти полностью их лишены. В поджелудочной железе крыс обычно можно наблюдать все 4 типа островков, но подсчет островков различного типа способствует иллюстрации секреторного цикла железы. У контрольных 15-суточных крысят соотношение типов островков Лангерганса стабильно и свидетельствует о преобладании островков 1-го и 2-го типа. 1-й тип островков отражает преимущественно фазу накопления и депонирования секрета (рис. 1), а 2-й тип островков, в которых альдегид-фуксинофильные гранулы преимущественно смещены к капиллярному полюсу цитоплазмы – фазу выделения секрета.

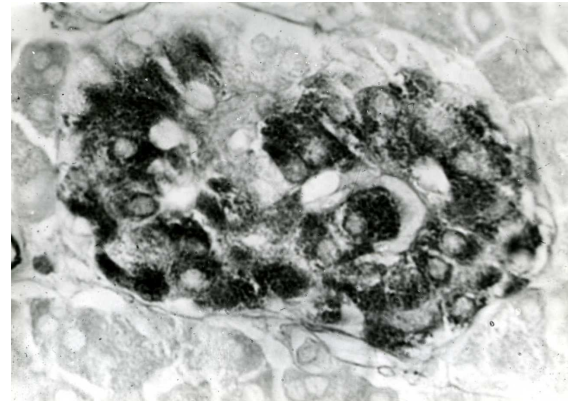


Рисунок 1 – Содержание альдегид-фуксинофильной зернистости в островке поджелудочной железы контрольных 15-суточных крысят. Окраска альдегид-фуксином по Гомори. $\times 640$

У опытных 15-суточных крысят, родившихся от матерей с экспериментальным подпеченочным обтурационным холестазом, площадь эндокринной ткани относительно всей площади паренхимы поджелудочной железы уменьшилась почти на 20% (табл. 1).

Таблица 1 – Морфометрические показатели эндокринных островков поджелудочной железы контрольных и опытных крысят

Показатели	Группы животных	
	контроль	опыт
Площадь островковой ткани		
абс., мкм ²	13675 ± 470	10910 ± 321*
%	2,65 ± 0,10	2,16 ± 0,08*
Количество островков на площади 10 мкм ²	9,58 ± 0,20	7,9 ± 0,27*
Общее количество клеток в одном среднем островке	55,86 ± 0,96	50,12 ± 0,83*

Примечание: * - различия показателей значимы по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Морфометрический анализ свидетельствует, что это произошло в основном за счет уменьшения количества островков на стандартной площади среза. Кроме того, для определения процентного соотношения островков с различным количеством клеток мы произвели их разбивку на классы: I класс – 5-16 клеток, II класс – 16-30 клеток, III класс – 31-60 клеток, IV класс – 1-100 клеток, V класс – более 100 клеток [13]. Выявлено, что как у контрольных, так и опытных крысят преобладает доля островков средних размеров (третий класс) (рис. 2). Однако среди оставшихся классов у опытных крысят чаще, чем у контрольных, встречаются мелкие островки – по 2-3 или несколько клеток. Общее количество клеток в одном среднем островке также снизилось (табл. 1).

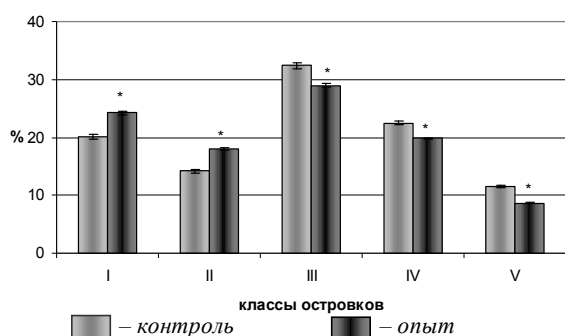


Рисунок 2 – Распределение эндокринных островков поджелудочной железы контрольных и опытных 15-суточных крысят по размерным классам (%)

Примечание: * - различия значимы ($p < 0,05$).

Изучение функциональной активности инсулиноцитов опытных крысят по содержанию альдегид-фуксифильных гранул показало перераспределение типов островков Лангерганса соответственно накоплению и опустошению специфических В-гранул как проявление синтеза и секреции инсулина. Оно выражалось в увеличении количества дегранулированных форм клеток и островков 3-го и 4-го типа (рис. 3).

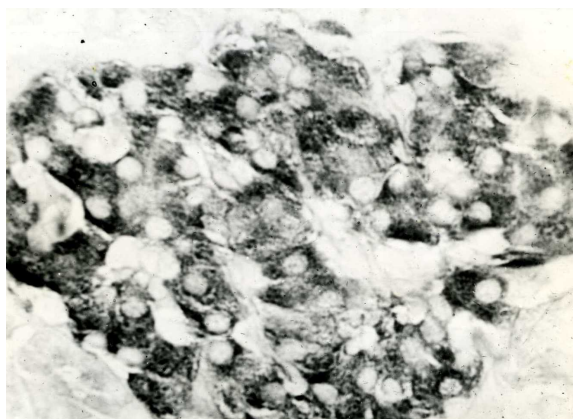


Рисунок 3 - Содержание альдегид-фуксифильной зернистости в островке поджелудочной железы опытных 15-суточных крысят. Окраска альдегид-фуксином по Гомори. $\times 640$

Заключение

Подпеченочный экспериментальный холестаза беременных самок приводит у 15-суточного потомства к уменьшению площади эндокринной ткани, что происходит за счет снижения количества островков на стандартной площади среза, среднего количества клеток в одном островке и увеличения доли островков малого размера.

Наряду с этим отмечается перераспределение типов эндокринных островков по их функциональной активно-

сти, свидетельствующее об усилении процессов дегрануляции инсулиноцитов.

Литература

1. Брюхин, Г.В. Антителообразующая способность клеток селезенки потомства крыс с хроническим поражением печени / Г.В. Брюхин, Г.Н. Михайлова // Физиологический журнал. – 1989. – Т. 35, № 2. – С. 97-100.
2. Буков, С.Г. Заболевания органов пищеварения у беременных / С.Г. Буков. – М.: Крон-Пресс, 1996. – 119 с.
3. Грицюк, Р.И. Особенности развития детей при хронических заболеваниях печени у матери / Р.И. Грицюк // Педиатрия. – 1970. – № 6. – С. 59-61.
4. Донеv, С. Степени различия бетагранулированности островков Лангерганса крысы / С. Донеv, Т. Христова, М. Зафирова // Мед. биол. пробл. – 1978. – № 6. – С. 21-31.
5. Кизюкевич, Л.С. Реактивные изменения в почках при экспериментальном холестазе: монография / Л.С. Кизюкевич. – Гродно: ГрГМУ, 2005. – 239 с.
6. Кизюкевич, Л.С. Экстрапеченочный обтурационный холестаза матери и развитие организма потомства / Л.С. Кизюкевич, Я.Р. Мацюк // Педиатрия. – 2002. – № 3. – С. 75-78.
7. Меркулов, Г.А. Курс патогистологической техники / Г.А. Меркулов. – Изд-во «Медицина» Ленинградское отделение, 1969. – 423 с.
8. Морфологические свойства органов пищеварительной и мочеполовой систем 45-суточных крысят, родившихся от самок с экспериментальным холестазом / Я.Р. Мацюк [и др.] // Журнал ГрГМУ. – 2005. – № 4. – С. 44-46.
9. Структурно-метаболические последствия холестаза для взрослого и развивающегося организма / С.М. Зиматкин [и др.] // Журнал ГрГМУ. – 2008. – № 4. – С. 7-9.
10. Шляхова, Г.Н. Экстрагенитальная патология и беременность / Г.Н. Шляхова; под ред. Г.Г. Орловой. – 1992. – С. 64-71.
11. Chiang, J.Y. Regulation of file synthesis: pathway, nuclear receptors and mechanisms / J.Y. Chiang // J. Hepatol. – 2004. – № 40. – P. 539-551.
12. Dupre, Y. Stimulation of release of insulin by an extract of intestinal mucosa / Y. Dupre, Y.C. Beck // Diabetes. – 1966. – № 15. – P. 555-559.
13. Heterogeneity of the langergans islets morphology in conditions of hypo- and hyperglycemia / S. Donev [et al.] // Мед. прегл. Ser. period. / Мед. унив. София. Центр. инф. мед. – 2001. – V. 4, № 1. – С. 3-10.
14. Leriche, R. Essai sur le traitement chirurgical du diabete par la derivation biliaire: documents experimentaux et clinicues / R. Leriche, A. Young // Ann. Endocrinol. – 1939. – № 1. – P. 3-10.
15. McInture, N. New interpretation of oral glucose tolerance / N. McInture, C.D. Holdsworth, D.S. Turner // Lancet. – 1964. – № 2. – P. 20-21.
16. Morgan, L.M. The role of entero-insular axis in insulin secretion / L.M. Morgan // Biochem. Soc. Trans. – 1990. – V. 18, № 1. – P. 101-102.
17. Reyes, H. Bile acids and progesterone metabolites in intrahepatic cholestasis of pregnancy / H. Reyes, Y. Sjoall // Ann. Med. – 2000. – V. 32, № 2. – P. 94-106.

Поступила 18.11.2010