

ПОКАЗАТЕЛИ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СТАТУСА ИНСУЛИНОЦИТОВ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРЫСЯТ, РОДИВШИХСЯ В УСЛОВИЯХ ХОЛЕСТАЗА

Л.А. Можейко, к.м.н., доцент

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

В настоящем исследовании гистохимическими и цитофотометрическими методами изучались метаболические изменения В-клеток эндокринной части поджелудочной железы потомства белых крыс, родившихся от матерей с подпеченочным обтурационным холестазом, вызванным на 17-й день беременности. Анализ полученных данных показал уменьшение активности НАДН-дегидрогеназы, содержания фосфолипидов, рибонуклеопротеидов и возрастание активности лактатдегидрогеназы и кислой фосфатазы.

Ключевые слова: поджелудочная железа, В-клетки, обтурационный холестаз, потомство.

In the present investigation the metabolic changes of endocrine pancreas have been studied by histochemical and cytophotometrical 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 in the succinate dehydrogenase, NADH-dehydrogenase activity and phospholipids, ribonucleoproteids content and the increase in the lactate dehydrogenase and acid phosphatase activity.

Key words: pancreas, B-cells, obturational cholestasis, posterity.

Введение

В последние годы ощутимо снизилось количество мертворождений и других осложнений при родах. Это достигнуто в значительной мере благодаря правильной тактике ведения беременности и своевременному принятию профилактических мер. Необходима дальнейшая работа в этом направлении. Анализ клинических наблюдений показал, что нередко течение беременности осложняется холестазом [5]. Внутрипеченочный холестаз может быть следствием любого патологического процесса в печени вирусной, лекарственной, токсической или другой этиологии, как остро возникшего при беременности, так и предшествовавшего ей. Встречается также внепеченочный холестаз, развивающийся при механической обструкции магистральных внепеченочных или главных внутрипеченочных протоков разного генеза, чаще всего в результате образования камней [1]. При патологическом течении беременности холестаз может проявляться и как самостоятельное заболевание – внутрипеченочный холестаз беременных. Этиология его не ясна, между тем он занимает второе место после острого вирусного гепатита среди причин желтухи у беременных – 20-25% случаев. Предполагается, что в основе заболевания лежит генетическая предрасположенность к необычной холестагической реакции на продуцируемые во время беременности эстрогены [5]. Внутрипеченочный холестаз беременных характеризуется началом, как правило, в III триместре, нарастанием клинических проявлений к родам и исчезновением после родов, нередко рецидивирующим характером при повторных беременностях.

Системы детоксикации, прежде всего печень, во время беременности несут дополнительную нагрузку, обезвреживая продукты метаболизма плода. Считается, что в основе холестаза лежат нарушения транспортных процессов в гепатоцитах и желчных канальцах под влиянием повреждающих факторов, прежде всего накапливающихся в крови гепатотоксичных желчных кислот, обладающих выраженными поверхностно-активными свойствами (хенодесоксихолевой, метохоловой, дезоксихолевой) и эстрогенов, способных усиливать холестаз [13]. Нарастание признаков холестаза у беременных приводит к увеличению риска осложнений и неблагоприятного воздей-

ствия на развитие плода. Как установлено в клинической практике, в 10-13% случаев это заканчивается такими осложнениями, как преждевременные роды, спонтанные выкидыши, кровотечения, антенатальная гибель плода [4, 5, 10].

При постнатальном развитии детей, рожденных от матерей с нарушениями гепато-билиарной системы, отмечаются заболевания органов дыхания, пищеварительного тракта, психоневрологические расстройства [3]. На экспериментальных моделях холестаза у животных установлены структурные изменения в почках, яичниках, желудке родившегося потомства [7, 9]. Менее изучено состояние эндокринных органов, в частности, эндокринного аппарата поджелудочной железы. Между тем сведения о метаболическом статусе и секреции инсулина в этих условиях, как одного из адаптивных гормонов, представляет несомненный интерес. Метаболический статус клеток можно оценивать по результатам определения ряда ферментов, являющихся показателями их обмена. Для В-клеток эндокринных островков поджелудочной железы достаточно информативными являются прежде всего показатели активности дегидрогеназ – сукцината, восстановленного никотинамидадениндинуклеотида, лактата. Так как В-клетки – инсулинпродуцирующие клетки, в них интенсивно протекают процессы, связанные с углеводным обменом, которые обеспечивают энергией секрецию и выделение инсулина. Эти оксидоредуктазы представляют различные пути метаболизма глюкозы – аэробного и анаэробного (гликолиза).

Учитывая вышеизложенное, целью настоящей работы явилось изучение влияния экспериментального обтурационного подпеченочного холестаза, вызванного на 17 день беременности самок, на метаболический статус инсулиноцитов поджелудочной железы родившихся от них крысят.

Материал и методы

Опыты проводились на беспородных половозрелых белых крысах-самках массой 165-180 г и родившихся от них крысятах. На пике репродуктивной активности половозрелые крысы помещались в клетку из расчета 1 самец – 3 самки и содержались при оптимальных условиях

для спаривания. Обнаружение во влагалищном мазке спермиев считалось первым днем беременности. Покрытые самки разделили на 2 группы – контрольную (7 крыс) и опытную (13 крыс). Опытным крысам через 17 дней после определения у них беременности, т.е. в период активного образования органов, моделировали холестаз путем перевязки общего желчного протока на 3-5 мм ниже места слияния долевых протоков печени с последующей перерезкой его между лигатурами. Контрольным крысам производилась лапаротомия без последующей перевязки общего желчного протока, вследствие чего в течение всего эксперимента у них сохранялся физиологический отток желчи. За самками и родившимися от них крысятами велось тщательное наблюдение.

На 15 сутки развития (ранний постнатальный период) родившихся животных (10 контрольных и 12 опытных крысят) подвергали эвтаназии парами эфира. Кусочки для исследования поджелудочной железы иссекали из селезеночного ее отдела. Материал, фиксированный в жидкости Буэна, заключали в парафин. Изготовленные парафиновые срезы окрашивали для выявления эндокринных островков паральдегид-фуксином по методу Гомори. Материал поджелудочной железы, замороженный в жидком азоте, монтировали на объектодержателе параллельно «контроль-опыт» и помещали в криостат, где при $t - 15^{\circ}$ приготавливали срезы толщиной 10 мкм. Затем общепринятыми гистохимическими методами определяли активность ключевых ферментов – сукцинатдегидрогеназы (СДГ), дегидрогеназы восстановленного никотинамидадениндинуклетиды (НАДН-ДГ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), кислой и щелочной фосфатаз (КФ и ЩФ), содержание рибонуклеопротеидов (РНП), фосфолипидов [8]. Количественную оценку активности продуктов реакции проводили при помощи системы компьютерного анализатора изображения Bioscan NT-2,0 (It Lab, Беларусь) при увеличении микроскопа (Carl Zeiss Jena, Германия) в 400 раз. Полученные цифровые данные обрабатывали статистическими методами с помощью компьютерной программы Statistica 6,0 для Windows (Stat. Soft inc., США).

Результаты и их обсуждение

Результаты исследования показали, что оксидоредуктазный потенциал инсулиноцитов крысят довольно высок. Как известно, сукцинатдегидрогеназа является важным ферментом аэробного распада углеводов в цитратном цикле (цикле Кребса). Она обладает исключительной специфичностью и осуществляет окисление только янтарной кислоты и восстановление своей простетической группы. Акцептированные атомы водорода СДГ способна транспортировать на цитохромную систему. СДГ – чисто митохондриальный фермент, локализующийся преимущественно на внутренней мембране митохондрий. На гистохимических препаратах в В-клетках эндокринных островков у контрольных крысят он выявляется в виде окрашенных гранул формазана мелких и средних размеров по всей цитоплазме клеток с преимущественной концентрацией вокруг ядра.

Еще выше в инсулиноцитах цитофотометрические показатели активности другого митохондриального фермента – НАДН-ДГ, – участвующего в переносе электронов (рис. 1). Он представляет собой важное связующее звено между конечными продуктами распада углеродного скелета и дыхательной цепью. Локализация его в В-клетках сходна с локализацией СДГ. Как показали результаты качественного анализа ферментов, гликолитический путь также используется инсулиноцитами. На последнем

этапе гликолиза пировиноградная кислота акцептирует водород от образовавшегося ранее восстановленного никотинамидадениндинуклетиды и превращает в конечный продукт – молочную кислоту. Данный процесс катализируется лактатдегидрогеназой. Она же может катализировать превращение молочной кислоты в пировиноградную, но равновесие реакции все-таки сильно сдвинуто в сторону молочной кислоты. Поэтому лактатдегидрогеназу можно рассматривать в качестве ключевого показателя гликолиза, а ее активность – мерой интенсивности анаэробного окисления. Кроме того, лактатдегидрогеназа является единственным звеном, сопрягающим гликолитический путь обмена глюкозы с лимоннокислым циклом. Цитофотометрические показатели активности ЛДГ у контрольных крысят несколько ниже показателей НАДН-ДГ (рис. 1). Гранулы окрашенного продукта реакции располагаются в цитоплазме инсулиноцитов довольно плотно, особенно в перинуклеарной зоне.

Определение активности кислой фосфатазы в клетках обычно используется для характеристики функций лизосом как их маркерного фермента. В инсулиноцитах контрольных крысят выявился самый высокий уровень активности этого фермента среди всех изучавшихся (рис. 1).

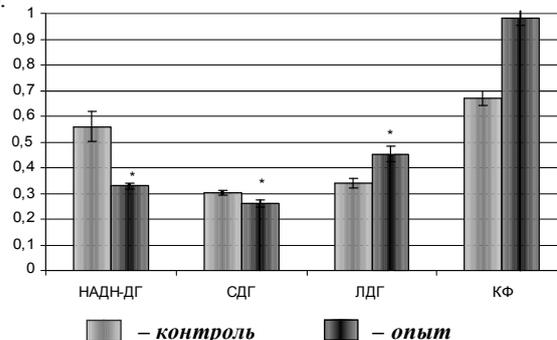


Рисунок 1 – Показатели активности ферментов в В-эндокриноцитах поджелудочной железы 15-суточных крысят контрольной и опытной групп (в ед.опт.пл.)
Примечание: * - различия значимы ($p < 0,05$).

Интенсивно окрашенные мелкие гранулы диффузно распределены по цитоплазме клетки, благодаря чему островки четко выделяются на фоне слабо окрашенной экзокринной паренхимы (рис. 2). В противоположность этому активность оксидоредуктаз в последней всегда несколько больше, а островки бледнее, но такого контраста, как в случае с кислой фосфатазой, не наблюдается. Метод Гомори для выявления кислой фосфатазы можно рекомендовать в качестве индикатора эндокринных ост-

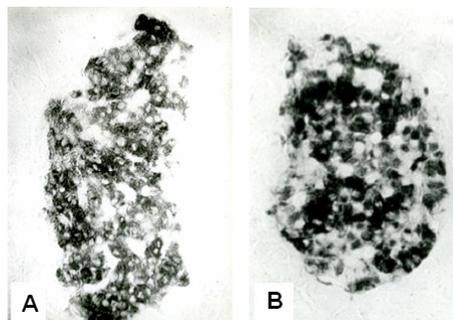


Рисунок 2 – Активность кислой фосфатазы в В-клетках островков поджелудочной железы контрольных (А) и опытных (В) 15-суточных крысят. Окраска по методу Гомори. Увеличение $\square 400$.

ровков в поджелудочной железе. Активность щелочной фосфатазы – фермента трансмембранного переноса фосфорорганических соединений – в инсулиноцитах крысят выявить не удалось. Однако она хорошо выявлялась в глюкагоноцитах и стенке кровеносных капилляров.

Рибонуклеопротеиды и фосфолипиды – показатели, соответственно, белкового и липидного обмена – в отличие от экзокринной паренхимы в инсулиноцитах крысят определяются в существенно меньшем количестве, обычно в виде мелкой зернистости, равномерно распределенной по цитоплазме.

Окраска специфических гранул В-клеток альдегидфуксином у контрольных крысят показала преобладание эндокринных островков с равномерным распределением гранул по цитоплазме клеток или со смещением к капиллярному полюсу. Дегранулированных клеток выявляется около 10%.

Установлено, что в раннем постнатальном периоде онтогенеза у 80% 15-суточных крысят, родившихся от крыс-самок с экспериментальным подпеченочным холестазом в В-эндокриноцитах поджелудочной железы, выявлены метаболические изменения. При этом сдвиги показателей оксидоредуктаз носят разнонаправленный характер. Уровни активности СДГ и восстановленного НАД свидетельствуют об устойчивой тенденции к снижению (рис. 1). При светооптическом изучении гранулы в большинстве клеток имеют мелкий размер, но среди них изредка встречались клетки с конгломератами гранул. В противоположность этим ферментам на гистохимических препаратах отчетливо заметно возрастание активности ЛДГ, что отражается и в цитофотометрических показателях (рис. 1).

Общий уровень активности КФ у опытных крысят возрастает, хотя следует отметить гетерогенность ее реакции. В части клеток гранулы настолько многочисленны, что нередко сливаются вместе и полностью заполняют цитоплазму. В других клетках зернистость сохранилась частично или может отсутствовать (рис. 2).

Отмечается незначительное падение содержания фосфолипидов и РНП, которое также носит гетерогенный характер. Гетерогенность в популяции В-клеток связывается с асинхронностью их функционального ответа [12, 14].

Дополнительное окрашивание альдегидфуксином специфических гранул, содержащих инсулин, показало увеличение до 40% количества дегранулированных В-эндокриноцитов у опытных крысят по сравнению с контрольными.

Снижение показателей активности сукцината и восстановленного НАД в В-эндокриноцитах поджелудочной железы опытных крысят можно расценивать как торможение окислительно-восстановительных процессов, которое обычно сопровождается падением функционального потенциала клеток. Однако одновременное увеличение ЛДГ может свидетельствовать о компенсаторной перестройке метаболических процессов на уровне митохондрий и возрастании роли гликолитического пути обеспечения энергией инсулиногенеза. Что касается кислот фосфатазы, то многие авторы отмечают, что, несмотря на предпочтительную активность среди ферментов В-эндокриноцитов поджелудочной железы, функциональное значение ее до конца не выяснено. Биохимическое

изучение В-клеток с помощью радиоактивного лейцина в условиях инкубации с различной концентрацией глюкозы показало положительную корреляцию активности КФ с синтезом инсулина [11]. Однако остается открытым вопрос, в какой процесс вовлекается этот лизосомальный фермент: процесс синтеза инсулина, упаковку секреторного материала, превращения проинсулина в инсулин, выделения его, либо какой-нибудь другой. Имеются сведения о возможной роли этих гидролаз в изменениях протеинов мембран гранул инсулина [13]. То, что повышение активности фермента у опытных крысят совпадает с увеличением доли дегранулированных В-эндокриноцитов при окрашивании альдегид-фуксином, может косвенно свидетельствовать об их взаимосвязи. Данные S.Landstrom с соавт. [13] подтверждают вовлеченность лизосом в процесс адаптации В-клеток при изменении функциональных требований к ним.

Таким образом, подпеченочный экспериментальный холестаза в определенной степени изменяет метаболизм инсулиноцитов поджелудочной железы, что может отразиться на их функциональной активности.

Литература

1. Желчнокаменная болезнь и беременность: причинно-следственные взаимосвязи / В.А. Петухов [и др.] // *Анналы хирургии*. – 1998. – № 2. – С. 14-20.
2. Канн, В.К. Диагностика и лечение больных с синдромом холестаза / В.К. Канн // *Русский медицинский журнал*. – 1998. – Т. 7. – С. 460-465.
3. Кизюкевич, Л.С. Экстрапеченочный обтурационный холестаза матери и развитие организма потомства / Л.С. Кизюкевич, Я.Р. Мацюк // *Педиатрия*. – 2002. – № 3. – С. 75-78.
4. Ключарева, А.В. Внутрисеченочный холестаза беременных / А.В. Ключарева, Л.В. Вавилова // *Здравоохранение*. – 2007. – № 3. – С. 72-73.
5. Кузьмин, В.Н. Состояние проблемы желтухи и холестаза у беременных в современном акушерстве / В.Н. Кузьмин // *Гинекология*. – 2009. – Т. 11, № 6. – С. 8-12.
6. Меркулов, Г.А. Курс патогистологической техники / Г.А. Меркулов. – Изд-во «Медицина» Ленинградское отделение, 1969. – 423 с.
7. 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.
8. Пирс, Э. Гистохимия (теоретическая и прикладная) / Э. Пирс. – М.: «Иностранная литература», 1962. – 962 с.
9. Структурно-метаболические последствия холестаза для взрослого и развивающегося организма / С.М. Зиматкин [и др.] // *Журнал ГрГМУ*. – 2008. – № 4. – С. 7-9.
10. Шехтман, М.М. Экстрагенитальная патология и беременность / М.М. Шехтман. – Л.: Медицина, 1987. – С. 90-109.
11. Chatterjee, A.K. Acid phosphatase activities as an index of pancreatic beta-cell function / A.K. Chatterjee, S.K. Mukherjee // *Indian J. Exp. Biol.* – 1981. – V 19. – P. 228-230.
12. Heterogeneity of the langerhans islets morphology in conditions of hypoglycemia and hyperglycemia / S. Donev [et al.] // *Med. pregl. Ser. period.* / *Мед. унив. София. Центр. инф. мед.* – 2001. – V. 4, № 1. – С. 3-10.
13. Lysosomes and pancreatic islet function time course of insulin biosynthesis, insulin secretion, and lysosomal transformation after rapid changes in glucose concentration / A.H. Landstrom [et al.] // *Diabetes*. – 1988. – V 37, № 3. – P. 309-316.
14. Pancreatic B-cells are heterogeneous in their capacity to metabolize glucose / A. De Vos [et al.] // *Diabetologia*. – 1991. – V 34, № 2. – P. 72-75.

Поступила 17.02.2011