

Т. Е. Кузнецова<sup>1</sup>, С. Л. Кабак<sup>2</sup>

## ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА $\beta$ -КЛЕТКИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС

<sup>1</sup>Институт физиологии НАН Беларуси,

<sup>2</sup>Белорусский государственный медицинский университет

Цель исследования – в эксперименте выявить структурные изменения эндокринной части поджелудочной железы потомства самок белой крысы, подвергавшихся разделному и сочетанному действию химических поллютантов. Установлено, что воздействие ацетатом свинца и нитратом натрия вызывает структурно-функциональные нарушения в эндокринном аппарате поджелудочной железы потомства экспериментальных крыс. Выявленные в клетках эндокринной части поджелудочной железы изменения в дальнейшем, по всей видимости, приведут к системным нарушениям метаболизма углеводов.

**Ключевые слова:**  $\beta$ -клетки панкреатических островков, активность ферментов, ультраструктура.

Aim of this study – in experiment to reveal structural changes of endocrine part of pancreas of offspring of females of the white rats caused by the separate and combined action of chemical pollutants. It is set that over influence of acetate of lead and sodium nitrate leads to development of structural-functional violations in the endocrine apparatus of pancreas of offspring of experimental rats. Described in the endocrine cells of the pancreas changes, obviously, can predetermine the further development of systemic metabolic disturbances of carbohydrate.

**Key words:**  $\beta$ -cells of pancreatic islets, the enzyme activity, ultrastructure.

В силу морфофункциональной незрелости зародыши млекопитающих животных отличаются повышенной чувствительностью к антропогенному воздействию [9, 16]. Рождение полноценного потомства, способного эффективно адаптироваться к условиям окружающей среды, во многом определяется условиями развития органов и систем в процессе эмбриогенеза. К сожалению, часто физиологическое течение данного процесса оказывается нарушенным в результате воздействия токсических веществ в период беременности [3, 17].

В основе патологических изменений эндокринной части поджелудочной железы, ведущих к развитию сахарного диабета, по мнению ряда исследователей, лежит генетическая предрасположенность, которая реализуется в болезнь после действия средовых факторов [6, 11, 21]. Ряд химических веществ, действуя опосредованно через организм матери, могут инициировать аутоиммунные процессы в поджелудочной железе потомства, следствием которых является деструкция

$\beta$ -клеток островков Лангерганса. Однако до настоящего времени морфологические и функциональные изменения в железе, возникающие в перинатальный период развития экспериментальных животных при раздельном и сочетанном действии таких широко распространенных химических поллютантов, как соли свинца и нитраты, в литературе описаны недостаточно полно.

Цель исследования – выявить структурно-функциональные изменения в эндокринной части поджелудочной железы потомства самок белой крысы, подвергшихся раздельному и сочетанному действию химических поллютантов.

#### **Материалы и методы исследования.**

Экспериментальные исследования проведены на беспородных белых крысах (беременных самках) с начальной массой 200 – 240 г. Контрольные и экспериментальные группы животных содержались в стационарных условиях вивария с естественным освещением, на стандартном рационе и питьевом режиме *ad libitum*. С первого дня беременности растворы ацетата свинца в дозе 1 мг/кг и нитрата натрия в дозе 20 мг/кг давали на куске белого хлеба до кормления. Крысы контрольной группы получали белый хлеб, смоченный проточной водой.

Объектом исследования служила поджелудочная железа потомства экспериментальных животных. Однодневные крысы выводились из опыта под легким эфирным наркозом. После декапитации у них извлекалась поджелудочная железа для последующего гистологического, гистохимического и электронно-микроскопического исследования.

Гистологические, гистохимические и электронно-микроскопические исследования проводились на материале, взятом, как правило, у одного животного. Срезы толщиной 10 мкм окрашивали по общепринятой методике гематоксилином и эозином, а также паральдегидфуксином по Гомори. На серийных гистологических срезах поджелудочной железы производили определение абсолютной и относительной площади тканевых структурных компонентов поджелудочной железы (стромы и эндокринной паренхимы), площади островков Лангерганса. Гистологические срезы оценивались с помощью метода компьютерной количественной морфометрии [1]. С помощью объект-микрометра была проведена калибровка системы анализа изображений, при которой найдено соответствие микрометров пикселям на экране монитора для определения размеров структурных компонентов поджелудочной железы в абсолютных единицах – микрометрах (мкм) и значения площади (в мкм<sup>2</sup>) без соответствующего пересчета по формулам.

Функциональное состояние  $\beta$ -клеток оценивалось по активности ферментов, характеризующих интенсивность их метаболизма. Активность НАДФН-диафоразы, сукцинат- и лактатдегидрогеназы определяли в криостатных срезах поджелудочной железы тетразолиевым методом по методике Лойда [7]. Активность ферментов оценивали по оптической плотности продукта реакции в цитоплазме, выражая результаты в относительных единицах оптической плотности. Исследование микропрепаратов, морфометрию и изготовление микрофотографий проводили с по-

мощью светового микроскопа MPV-2 (производитель «Leitz», Германия), оснащенного цифровой фотокамерой Leica DC300F (производитель «Leitz», Швейцария). Оцифрованные изображения записывали на компьютер с помощью программы Leica IM 1000 (производитель «Leitz», Швейцария) и затем обрабатывали с помощью программы Image J (National Institutes of Health, USA).

Электронно-микроскопическое исследование поджелудочной железы проводилось с учётом общепринятой методики Н.Н. Боголепова. Срезы приготавливали на ультратоме LKB-III, контрастировали цитратом свинца и просматривали на электронном микроскопе JEM-100CX (Япония).

Статическую обработку материала проводили с использованием пакета статистических программ Statistica 6 («StatSoft» США). О достоверности межгрупповых различий судили по t-критерию Стьюдента и критериям непараметрической статистики.

### **Результаты и обсуждение.**

В поджелудочной железе крысят в раннем постнатальном онтогенезе хорошо выявляется неоднородность распределения эндокринных островков в органе. В контрольной группе относительная плотность эндокринной ткани имеет максимальное значение на 1-е сутки после рождения. Изучение гистохимических препаратов поджелудочной железы новорожденных крысят показывает, что  $\beta$ -клетки имеют высокую активность изучаемых ферментов, что свидетельствует о соответствующем уровне синтетических процессов в данном возрастном периоде.

При исследовании ультраструктуры поджелудочной железы интактных новорожденных крысят можно наблюдать эндокринные клетки с характерным строением. Локализованные чаще всего в середине островка, они имеют округлую или овальную форму с центрально расположенным отчетливым ядром. Хроматин преимущественно мелкодисперсный, ядерная мембрана и поры легко различимы. Митохондрии обычно расположены в центре клетки, округлой, овальной или удлинённой формы, содержат умеренно плотный матрикс и поперечные кристы. Число митохондрий меняется в зависимости от функциональной активности клетки. Инсулиноциты новорожденных крысят характеризуются хорошо развитым комплексом Гольджи, что, в сочетании с другими ультраструктурными признаками, свидетельствует об их высокой функциональной активности.

В результате выполненных экспериментов удалось установить, что поступление токсических веществ вызывает структурные перестройки, выявляемые в органе на светооптическом уровне. Так отмечено значительное увеличение относительной площади стромы, причем наиболее значимые изменения регистрируются при сочетанном введении поллютантов (Рис. 1).

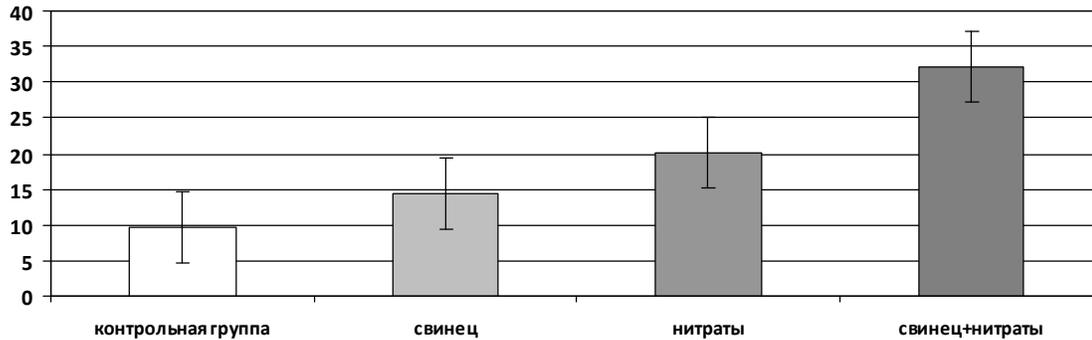


Рис. 1. Относительная площадь стромы поджелудочной железы (в %) новорожденных крысят контрольной и экспериментальной групп

Получены убедительные данные о влиянии поллютантов на содержание эндокринной паренхимы в органе. Антенатальное поступление поллютантов как по отдельности, так и сочетано, приводит к значительному уменьшению содержания эндокринной паренхимы.

Токсическое действие поллютантов также проявлялось в изменении размеров островков Лангерганса (Рис. 2). Изучение гистологических препаратов поджелудочной железы показало, что как раздельное, так и сочетанное введение ацетата свинца и нитрата натрия вызывает значимое уменьшение площади островков.

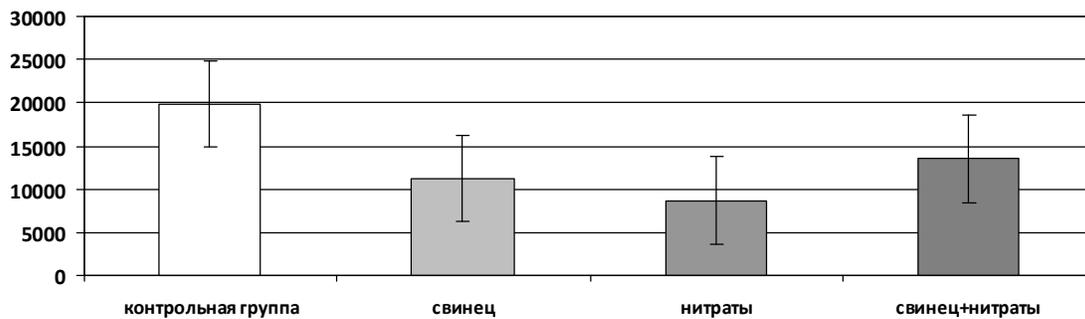


Рис. 2. Площадь островков Лангерганса поджелудочной железы (в  $\mu\text{m}^2$ ) новорожденных крысят контрольной и экспериментальной групп

У новорожденных крысят в ответ на воздействие поллютантов значимо увеличивается аэробное окисление глюкозы в цикле Кребса, на что указывает повышение активности ее ключевого фермента – СДГ (Рис. 3).

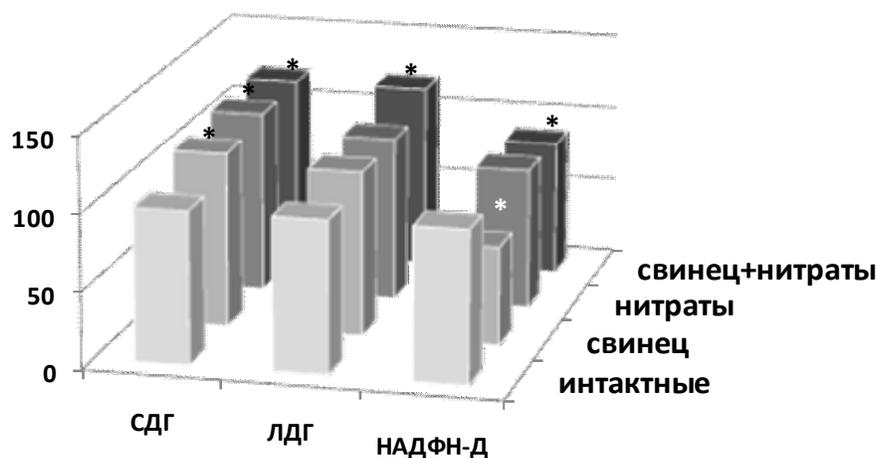


Рис. 3. Активность ферментов в  $\beta$ -клетках поджелудочной железы новорожденных крысят после раздельного и сочетанного действия поллютантов на организм матери, выраженная в процентах относительно контроля, принятого за 100%. \* – различия статистически достоверны по сравнению с контрольными показателями

Усиление гликолитических процессов в  $\beta$ -клетках регистрируется только при сочетанном введении поллютантов, что выражается в подъеме активности ЛДГ. Активность НАДФН-диафотазы значительно изменяется как при раздельном действии свинца, так и при сочетанном поступлении поллютантов, тогда как нитраты не оказывают влияния на активность этого фермента.

Таким образом, поллютанты, проникающие в организм потомства крыс трансплацентарно вызывают значимые изменения активности ферментов углеводно-энергетического обмена в  $\beta$ -клетках поджелудочной железы. Общеизвестно, что нарушение энергетического обеспечения процессов, протекающих в клетках, часто является инициальным и ведущим механизмом их повреждения. Энергоснабжение может нарушаться на этапах синтеза АТФ, транспорта, а также утилизации его энергии. Синтез АТФ может быть поврежден из-за дефицита кислорода и/или субстратов метаболизма, снижения активности ферментов тканевого дыхания и гликолиза, повреждения и разрушения митохондрий, в которых осуществляются реакции цикла Кребса и перенос электронов к молекулярному кислороду, сопряженный с фосфорилированием АДФ [5]. Нарушение процесса активации клеточных ферментов существенно изменяет интенсивность метаболических реакций и, как следствие, ведет к расстройству жизнедеятельности клетки.

Вызываемое поллютантами ингибирование митохондриальных ферментов, участвующих в метаболизме глюкозы и образовании из нее стимуляторов секреции инсулина, таких как ацетил-КоА и интермедиаты цикла Кребса, по всей видимости, приводит к нарушению секреции инсулина. Однако этот эффект не является специфичным, так как он характерен и для других цитотоксичных веществ (стрептозотозин, активные кислородные радикалы, мышьяк и др.) [6, 15, 20] и некоторых физических факторов окружающей среды [10].

Стимуляция анаэробного гликолиза в  $\beta$ -клетках выступает в роли универсальной реакции метаболизма на стресс. Усиление гликолиза является частным проявлением компенсаторной перестройки метаболизма, направленной на поддержание уровня энергетического обеспечения клеток в условиях усиления в них АТФ-зависимых процессов [4].

Нарушение процессов энергообеспечения, в свою очередь, может стать одним из факторов расстройств функции мембранного аппарата клеток, их ферментных систем, баланса ионов и жидкости, а также механизмов регуляции клетки. Если рассматривать энергетический обмен не отвлеченно, а исходя из морфофункциональных условий его адекватного обеспечения на различных системных уровнях, то следует указать, что одним из ведущих условий поддержания достаточной энергопродукции является состояние и функциональная активность биологических мембран. Важность участия биологических мембран в формировании биоэнергетических нарушений и развитии патологических процессов обусловлена тем, что существует прямая корреляция между морфофункциональным состоянием биомембран и интенсивностью внутриклеточной продукции и аккумуляции энергии. При этом, как уже установлено, повреждение мембран является первым событием в цепи нарушений, вызванных действием того или иного неблагоприятного фактора на организм.

В поджелудочной железе животных экспериментальных групп наблюдалась структурная перестройка клеток и клеточных органелл, вызываемая действием изучаемых поллютантов. В  $\beta$ -клетках новорожденных крысят при раздельном действии ацетата свинца выявлялась повышенная осмиофилия матрикса митохондрий, резкое расширение цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулула, некоторая гипертрофия комплекса Гольджи (Рис. 4). При воздействии нитрата натрия появляются ядра с признаками пикноза, разрушением ядерных мембран, набуханием митохондрий и частичной деструкцией крист, выявляются апоптотические тельца. Вместе с тем, большинство клеток в панкреатических островках сохраняли нормальную структуру, либо имели некоторые признаки функционального напряжения.

При сочетанном действии ацетата свинца и нитрата натрия происходит конденсация хроматина и изменение формы ядра, локальное разрушение мембран митохондрий, цистерн гранулярной эндоплазматической сети, комплекса Гольджи, в результате чего образуются ламеллярные структуры. Многие митохондрии подвергаются лизису, формируя многочисленные разной величины вакуоли, ограниченные мембраной. Наши исследования показали, что сочетанное воздействие ацетата свинца и нитрата натрия на организм новорожденных крысят оказывает более разрушительное действие на структурную организацию  $\beta$ -клеток, чем раздельное воздействие поллютантов.

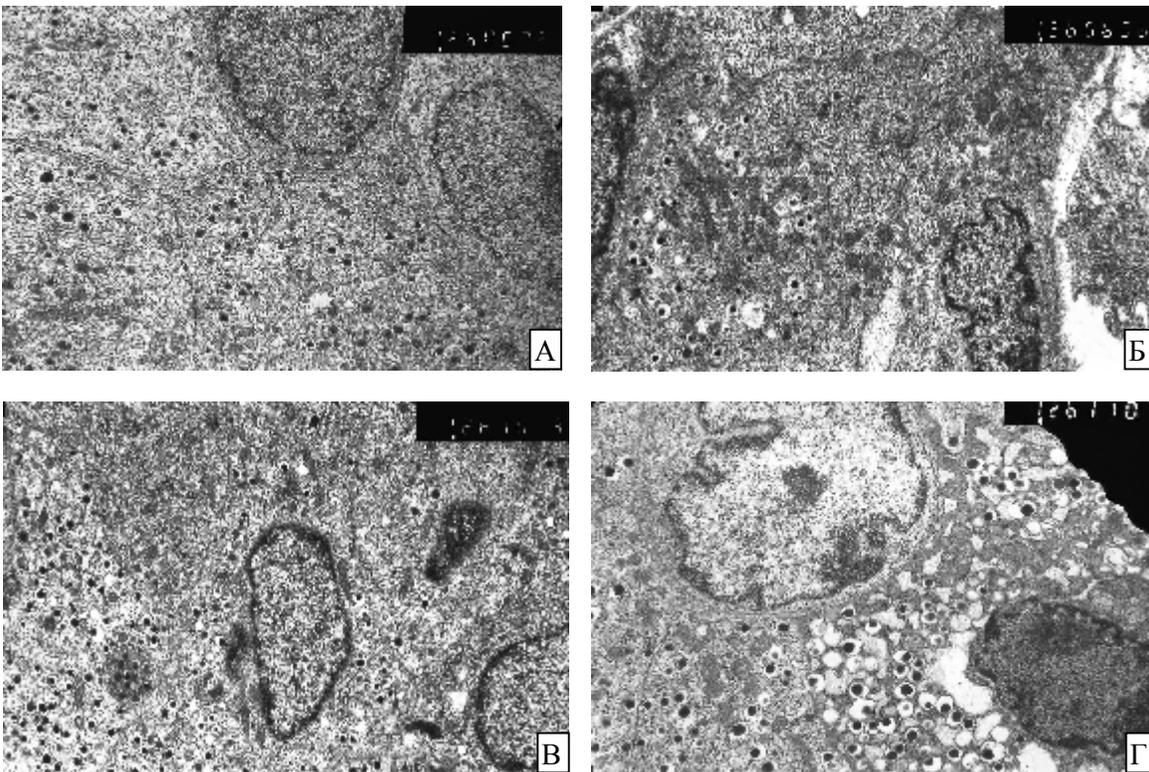


Рис. 4. Ультраструктура  $\beta$ -клеток панкреатических островков новорожденных крысят контрольной и экспериментальной групп. А – крыса контрольной группы; Б – после антенатального воздействия ацетата свинца; В – после антенатального воздействия нитрата натрия; Г – после сочетанного антенатального воздействия поллютантов.  $\times 7\ 200$

Под воздействием ацетата свинца в клетках эндокринной части железы наблюдается отчетливая осмиофилия матрикса митохондрий. Уплотнение матрикса митохондрий характеризует конденсированную энергетическую, митохондриальную конфигурацию по Чансу, когда не идет отвод электронов для метаболических целей клеток [2, 12]. Повреждение митохондрий в клетках всегда сопровождается нарушениями окислительного фосфорилирования и проницаемости наружных и внутренних мембран [14]. В литературе описано влияние продолжительного действия ацетата свинца на митохондрии экзокринных клеток поджелудочной железы взрослых крыс в эксперименте [27]. Бесспорна роль митохондрий  $\beta$ -клеток островков Лангерганса в процессе секреции инсулина [19, 23], а повреждение этих органелл приводит к дисфункции инсулиноцитов [17, 26, 28].

Повреждение ядер  $\beta$ -клеток животных экспериментальных групп проявлялось резким расширением перинуклеарного пространства, маргинацией хроматина или пикнозом ядра, отмечалось также разрушение ядерной мембраны. В эндокриноцитах поджелудочной железы подобные повреждения наблюдаются при действии других повреждающих факторов [10, 18].

Во всех сериях эксперимента наблюдалась более или менее выраженная дезорганизация мембран клеточных органелл. Структурные повреждения мембран сопровождаются изменениями

активности ферментов углеводно-энергетического обмена, регистрируемыми при помощи гистохимических исследований.

Описанные нами изменения ультраструктуры инсулоцитов во многом совпадают с деструктивными процессами, наблюдаемыми в инцизионных биоптатах поджелудочной железы больных инсулинзависимым сахарным диабетом [8].

Сочетанное действие поллютантов увеличивает тяжесть патологического процесса, что сопровождается появлением заметного числа клеток с признаками апоптоза, роль и значимость которого в недостаточности функции  $\beta$ -клеток при сахарном диабете первого и второго типа хорошо доказана [6, 22, 25]. При этом основным механизмом действия поллютантов, приводящим к гибели  $\beta$ -клеток, является окислительный стресс [13, 24].

Таким образом, в результате выполненного исследования установлено, что раздельное и сочетанное воздействие химических поллютантов (ацетат свинца и нитрат натрия) приводит к развитию структурно-функциональных нарушений в эндокринном аппарате поджелудочной железы потомства экспериментальных крыс. Описанные в клетках эндокринной части поджелудочной железы изменения, очевидно, могут предопределять в дальнейшем развитие системных нарушений метаболизма углеводов.

## Литература

1. *Автандилов, Г. Г.* Основы количественной патологической анатомии: учеб. пособие / Г. Г. Автандилов. М.: Медицина, 2002. 238 с.
2. *Биология сложных систем. Физико-биологическое и математическое моделирование функционирования органов и систем организма / А. Д. Белкин [и др.] // Вестник новых медицинских технологий. 2006. Т. XIII, № 3. С. 6–9.*
3. *Вельтищев, Ю. Е.* Экология и здоровье детей (экотоксикологическое направление). К концепции Республиканских научно-практических программ / Ю. Е. Вельтищев, В. В. Фокеева // Матер. и детство. 1992. № 12. С. 30–35.
4. *Генинг, Т. П.* Метаболические пути утилизации кислорода и продукция АТФ в ткани печени при острой циркуляторной гипоксии / Т. П. Генинг, Н. Н. Иванская // Вестник новых медицинских технологий. 2006. Т. XIII, № 3. С. 32–34.
5. *Зайко, Н. Н.* Патологическая физиология / Н. Н. Зайко, Ю. В. Быць. Киев: Логос, 1996. 647 с.
6. *Колесник, Ю. М.* Панкреатические островки: некоторые аспекты морфологии, физиологии и процессов деструкции при сахарном диабете типа 1 / Ю. М. Колесник, М. А. Орловский // Проблемы эндокринологии. 2004. Т. 50, № 2. С. 3–10.

7. *Лойда, З.* Гистохимия ферментов / З. Лойда, Р. Госсрау, Т. Шиблер. М.: Мир, 1982. 270 с.
8. *Севергина, Э. С.* Инсулинзависимый сахарный диабет – взгляд морфолога / Э. С. Севергина. М.: Видар-М, 2002. 152 с.
9. *Экология и здоровье детей* / под ред. М. Я. Студеникина, А. А. Ефимовой. М.: Медицина, 1998. 384 с.
10. *Aughsteen, A. A.* An ultrastructural study on the effect of streptozotocin on the islets of Langerhans in mice / A. A. Aughsteen // J. Electron Microsc. (Tokyo). 2000. Vol. 49, № 5. P. 681–690.
11. *Bernard-Kargar, C.* Endocrine pancreas plasticity under physiological and pathological conditions / C. Bernard-Kargar, A. Ktorza // Diabetes. 2001. Vol. 50, Suppl. 1. S. 30–35.
12. *Chance, B.* The energy-linked reaction of calcium with mitochondria / B. Chance // J. Biol. Chem. 1965. Vol. 240. P. 2729–2748.
13. *Drews, G.* Oxidative stress and beta-cell dysfunction / G. Drews, P. Krippeit-Drews, M. Düfer // Pflugers. Arch. 2010. Vol. 460, № 4. P. 703–718.
14. *Duchen, M. R.* Roles of Mitochondria in Health and Disease / M. R. Duchon // Diabetes. 2004. Vol. 53 (Suppl. 1). S96–S102.
15. *Effects of endosulfan on B cells of Langerhans islets in rat pancreas* / Y. Kalender [et al.] // Toxicology. 2004. Vol. 200, № 2–3. P. 205–211.
16. *Effects of lead exposure before pregnancy and dietary calcium during pregnancy on fetal development and lead accumulation* / S. Han [et al.] // Environ. Health Perspect. 2000. Vol. 108, № 6. P. 527–531.
17. *Fetal and neonatal nicotine exposure in Wistar rats causes progressive pancreatic mitochondrial damage and beta cell dysfunction* / J. E. Bruin [et al.] // PLoS One. 2008. Vol. 3, № 10. e 3371.
18. *Hagar, H. H.* A biochemical, histochemical, and ultrastructural evaluation of the effect of dimethoate intoxication on rat pancreas / H. H. Hagar, H. Azza, Fahmy // Toxicol. Lett. 2002. Vol. 133, № 2–3. P. 161–170.
19. *Halangk, W.* A unique pancreatic mitochondrial response to calcium and its role in apoptosis / W. Halangk, M.M. Lerch // Gut. 2009. Vol. 58, № 3. P. 328–330.
20. *Heavy metals, islet function and diabetes development* / Y. W. Chen [et al.] // Islets. 2009. Vol. 1, № 3. P. 169–176.
21. *Hettiarachchi, K. D.* Dietary toxins, endoplasmic reticulum (ER) stress and diabetes / K. D. Hettiarachchi, P. Z. Zimmet, M. A. Myers // Curr. Diabetes Rev. 2008. Vol. 4, № 2. P. 146–156.

22. *Mechanisms of Pancreatic  $\beta$ -Cell Death in Type 1 and Type 2 Diabetes. Many Differences, Few Similarities* / M. Cnop [et al.] // *Diabetes*. 2005. Vol. 54 (Suppl. 2). S97–S107.
23. *Mitochondrial regulation of insulin production in rat pancreatic islets* / G. Leibowitz [et al.] // *Diabetologia*. 2005. Vol. 48, № 8. P. 1549–1559.
24. *Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes* / D. Pitocco [et al.] // *Rev. Diabet. Stud.* 2010. Vol. 7, № 1. P. 15–25.
25. *Sesti, G. Apoptosis in the beta cells: cause or consequence of insulin secretion defect in diabetes?* / G. Sesti // *Ann. Med.* 2002. Vol. 34, № 6. P. 444–450.
26. *Sivitz, W. I. Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities* / W. I. Sivitz, M. A. Yorek // *Antioxid. Redox. Signal.* 2010. Vol. 12, № 4. P. 537–577.
27. *Szynaka, B. Ultrastructural changes in acinar cell mitochondria of the rat pancreas in the course of lead intoxication* / B. Szynaka, A. Andrzejewska // *Folia Histochem. Cytobiol.* 1996. Vol. 34, Suppl. 1. P. 17–18.
28. *Wollheim, C. B.  $\beta$ -Cell Mitochondria and Insulin Secretion. Messenger Role of Nucleotides and Metabolites* / C. B. Wollheim, P. Maechler // *Diabetes*. 2002. Vol. 51, Suppl. 1. S37–S42.