

Влияние ацетата свинца на развитие β -клеток поджелудочной железы у крысы

Институт физиологии НАН Беларуси, Белорусский государственный медицинский университет

Цель настоящего исследования – в условиях действия малых доз ацетата свинца во время беременности белых крыс и на протяжении лактационного периода выявить ранние структурно-функциональные изменения в эндокринной части поджелудочной железы, которые определяют последующие системные нарушения метаболизма углеводов. Выявлены изменения активности ряда ферментов углеводно-энергетического обмена и ультраструктурные преобразования в β -клетках крысят в возрасте 2 недель и 1,5 месяцев, носящие как деструктивный, так и компенсаторно-приспособительный характер.

Ключевые слова: β -клетки панкреатических островков, активность ферментов, ультраструктура.

The aim of present study - to identify early structural and functional changes in the endocrine part of pancreas, which determine the subsequent system infringements of metabolism of carbohydrates under exposure of low doses of lead acetate during pregnancy and the lactation period of white rats. Changes of activity of several enzymes of carbohydrate-energy metabolism and ultrastructural changes in β -cells of rats aged 2 weeks and 1,5 months, bearing a destructive and compensatory-adaptive character.

Keywords: β -cells of pancreatic islets, the enzyme activity, ultrastructure.

Среди факторов, оказывающих негативное влияние на организм человека и животных, одно из первых мест занимают тяжёлые металлы. Наиболее токсичным из них считается свинец и его соединения. При отравлении свинцом главным механизмом повреждающего действия является окислительный стресс [2], ведущий к нарушению баланса между образованием и «гашением» свободных радикалов. В результате возникает реальная угроза гибели отдельных клеток и организма в целом [12, 14, 19]. Прооксидантные эффекты свинца обычно более выражены при острых отравлениях. При его хроническом воздействии, например, при проживании в течение нескольких поколений на загрязнённых свинцом территориях, активность ферментов может возвращаться к исходному уровню или даже превосходить его благодаря включению многочисленных адаптационно-регуляторных или селективных механизмов [9].

Многочисленные экспериментальные данные демонстрируют наличие связи между окислительным стрессом, вызванным тяжёлыми металлами, и сахарным диабетом. В опытах на культуре β -клеток поджелудочной железы было показано, что соли свинца вызывают подъем активности индуцируемой NO-синтазы, ведущей к гибели клеток, отвечающих за синтез инсулина [10, 13]. Степень снижения уровня инсулина в крови у экспериментальных животных напрямую зависит от дозы свинца, которую они получали [11].

В последние годы в литературе значительное внимание уделяется изучению особенностей перинатального действия свинца. Особую опасность его воздействия на развитие плода определяет тот факт, что в ходе беременности происходит мобилизация свинца, ранее депонированного в костях матери. Поэтому прекращение поступления свинца извне не устраняет угрозу интоксикации потомства [8, 17]. Кроме того, многие авторы обращают внимание на негативное действие на плод значительно более низких уровней свинца в материнской крови, чем ожидалось ранее [8, 18]. В частности, Lidsky T.I., Schneider J.S. [16] считают, что вообще не существует безопасных уровней свинца, даже минимальные его дозы обладают нейротоксическим эффектом.

Цель исследования – в условиях действия малых доз ацетата свинца во время беременности белых крыс и на протяжении лактационного периода выявить ранние структурно-функциональные изменения в эндокринной части поджелудочной железы, которые определяют последующие системные нарушения метаболизма углеводов.

Материалы и методы исследования.

Эксперимент выполнен на беспородных белых крысах, которым с первого дня беременности и в течение трех недель лактации в рацион питания вводился ацетат свинца в дозе 1 мг/кг массы животного. Крысы контрольной группы получали обычный рацион питания. Обе группы животных содержались в стационарных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище.

Объектом исследования служила поджелудочная железа 63 крысят в возрасте 2 недель и 1,5 месяцев. По окончании эксперимента животных декапитировали под эфирным наркозом. Активность НАДФН-дегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ), ферментов, характеризующих метаболическую активность β -клеток, определяли в криостатных срезах толщиной 15 мкм по методу Лойда [5]. При этом оптическая плотность продукта реакции в цитоплазме клеток оценивалась с помощью компьютерной программы обработки данных Image J (National Institutes of Health, USA). Изучение гистохимических препаратов, морфометрию и изготовление микрофотографий проводили с помощью светового микроскопа MPV-2 («Leitz», Германия).

Для электронно-микроскопического исследования кусочки, полученные из тела поджелудочной железы, фиксировались в 3,0% растворе глутарового альдегида на фосфатном буфере при $t=40^{\circ}\text{C}$ на протяжении 3-х часов. Затем образцы измельчались и дополнительно фиксировались в 2% растворе четырехоксида осмия в течение 2 часов при $t=40^{\circ}\text{C}$. После завершения альдегид-осмиевой фиксации материал обезвоживался в спиртах восходящей крепости, заливался в эпон-аралдит по общепринятой схеме, изложенной в руководстве Н.Н. Боголепова [1]. Для полимеризации материал помещался в термостат при $t=37^{\circ}\text{C}$, а затем при $t=56^{\circ}\text{C}$ на 2 суток. Срезы готовились на ультратоме LKB (Швеция), контрастировали цитратом свинца, просматривались и фотографировались на электронном микроскопе JEM 100 CX (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 раннем постнатальном периоде (у 2-недельных крысят контрольной группы) основную массу поджелудочной железы составляет экзокринная часть. От соединительнотканной капсулы внутрь железы отходят тонкие междольковые перегородки, содержащие кровеносные сосуды, междольковые протоки и нервные волокна. Прослойки соединительной ткани разделяют железу на дольки, которые образованы ацинусами. Среди ацинарных клеток выявляются скопления эндокринных клеток, образующих панкреатические островки (островки Лангерганса). В раннем постнатальном онтогенезе в поджелудочной железе отчетливо выявляется неоднородность распределения панкреатических островков. Они располагаются в основном по ходу междольковых протоков и местами образуют большие скопления. В целом, следует отметить, что у 2-х недельных животных имеет место преобладание эндокринной части над экзокринной частью по сравнению с поджелудочной железой взрослых животных. Для островков Лангерганса крыс характерно сосредоточение инсулинпродуцирующих клеток в

центральной части островка. При этом они составляют основную массу эндокринных клеток.

У 2-недельных крысят, получавших ацетат свинца на протяжении внутриутробного периода развития, на тканевом уровне не выявлено существенных изменений в поджелудочной железе.

Изучение гистохимических препаратов поджелудочной железы 2-недельных крысят контрольной группы показывает, что β -клетки имеют высокую активность ферментов, что свидетельствует об уровне синтетических процессов в данном возрастном периоде. Под действием свинца изменяется активность ферментов углеводно-энергетического обмена в эндокриноцитах. На 21,3% ($p < 0,05$) повышается активность СДГ, фермента характеризующего процессы, происходящие в митохондриях, и на 18,9% ($p < 0,05$) снижается активность НАДФН-дегидрогеназы, участвующей в синтезе инсулина. Отмечено некоторое возрастание скорости гликолитических процессов, выражающееся в подъеме активности ЛДГ на 12,1% ($p < 0,05$). В комплексе полученные данные свидетельствуют о снижении скорости гормонопоэтических процессов в клетках.

При электронно-микроскопическом исследовании в эндокринной части поджелудочной железы двухнедельных крысят контрольной группы благодаря характерным особенностям строения хорошо выявляются инсулинпродуцирующие клетки. Они имеют округлую или овальную форму с центрально расположенным отчетливым ядром. Цитоплазма части клеток содержит многочисленные гранулы с характерной кристаллической сердцевиной, которые отделяются от окружающей их мембраны светлым амфорным материалом. Гранулы представляют собой скопления проинсулиновых продуктов или кристаллов инсулина. Эндокриноциты в составе панкреатических островков представлены гранулярным и агранулярным типами. Каждый из них соответствует разным фазам цикла секреторной активности клетки. Для β -клеток крысят 2-недельного возраста характерна некоторая гипертрофия эндоплазматической сети, что свидетельствует о высокой активности синтетических процессах. Митохондрии обоих типов клеток обычно расположены в их центре, имеют округлую, овальную или удлинённую форму, содержат умеренно плотный матрикс и поперечные кристы. Число митохондрий варьирует в зависимости от функциональной активности клетки.

При проведении электронно-микроскопического исследования поджелудочной железы животных экспериментальной группы было выявлено, что в состав панкреатических островков входят одновременно эндокриноциты, сохранившие нормальную структуру и патологически изменённые β -клетки с разной степенью выраженности этих изменений. Практически отсутствуют клетки с ультраструктурными признаками высокой активности синтетических процессов – наличием гранулярной эндоплазматической сети с расширенными цистернами и хорошо развитого аппарата Гольджи. Вместе с тем, обнаруживались клетки с электронно-плотной цитоплазмой, небольшим числом элементов гранулярной эндоплазматической сети и относительно небольшим количеством гранул (Рис.1 А). Встречаются также эндокриноциты с возросшим количеством вторичных лизосом, по сравнению с клетками животных контрольной группы (Рис.1 Б).

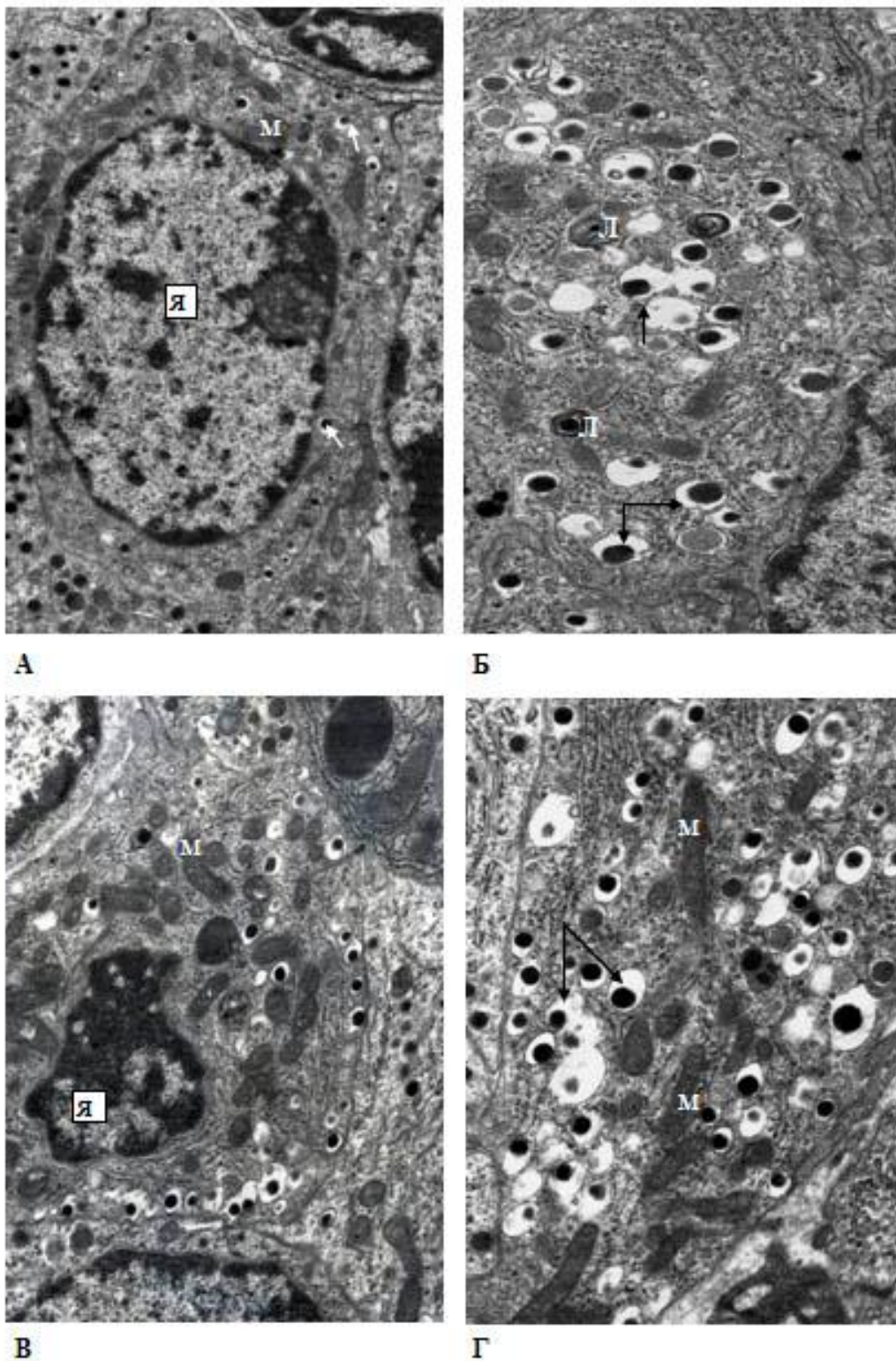


Рис. 1. Эндокриноцит (β -клетка) панкреатического островка 2-недельной крысы (экспериментальная группа). А – общий вид клетки; Б – вторичные лизосомы (Л); В – маргинация хроматина в ядре; Г – конденсация митохондрий. Я – ядро, М – митохондрии, секреторные β -гранулы обозначены стрелками. $\times 10000$ (А, В); $\times 14000$ (Б, Г).

Кроме того, в эндокринной части железы присутствовали клетки с измененным ядром. В некоторых из них наблюдалась маргинация хроматина, которая относится к обратимым изменениям. В части клеток выявлен пикноз ядра – необратимая тотальная конденсация

хроматина по всей его площади (Рис. 1 В). В клетках островков Лангерганса животных экспериментальной группы, в отличие от животных контрольной группы, встречались также клетки, содержащие электронно-плотные митохондрии с нечеткими утолщенными криптами. Этот структурный признак свидетельствует об их функциональном напряжении (Рис. 1 Г), которое подтверждается повышением активности фермента СДГ – показателя активности внутримитохондриальных процессов.

По всей видимости, выявленные ультраструктурные изменения в клетках железы экспериментальных животных в большинстве своем обратимы и не должны приводить существенным функциональным нарушениям.

К 1,5-месячному возрасту общий план строения поджелудочной железы у животных контрольной группы сохраняется без существенных изменений. Основную часть органа составляют ацинусы, среди которых разбросаны островки Лангерганса. При этом они расположены более равномерно, часть их не утрачивает связи с междольковыми протоками и крупными сосудами. У животных экспериментальной группы, подвергшихся действию ацетата свинца в антенатальный и ранний постнатальный периоды развития, на тканевом уровне не было выявлено никаких структурных изменений.

Анализ гистохимических препаратов позволил обнаружить определенные сдвиги в активности излучаемых ферментов углеводно-энергетического обмена в β -клетках железы. Активность СДГ по сравнению с таковой у 2-недельных крысят несколько снижалась, однако оставалась повышенной относительно контрольного уровня на 16,5% ($p < 0,05$). Выявлено статистически значимое, по сравнению с контролем, увеличение уровня ЛДГ – 18,1% ($p < 0,05$), что свидетельствует об активации гликолитических процессов в клетке. Указанные изменения активности ферментов свидетельствуют о том, что уровень функциональной активности β -клеток железы после свинцового воздействия снижен. Однако к 1,5-месячному возрасту уже можно констатировать начало компенсаторно-приспособительных процессов в ответ на первичное поражение.

Ультраструктурный анализ показывает, что строение β -клеток поджелудочной железы 1,5-месячных животных контрольной группы практически такое же как у зрелых животных. В эндокринной части присутствуют клетки гранулярного и агранулярного типов. В отличие от животных младшего возраста (2-недельного), не выявляются клетки с признаками повышенной синтетической активности.

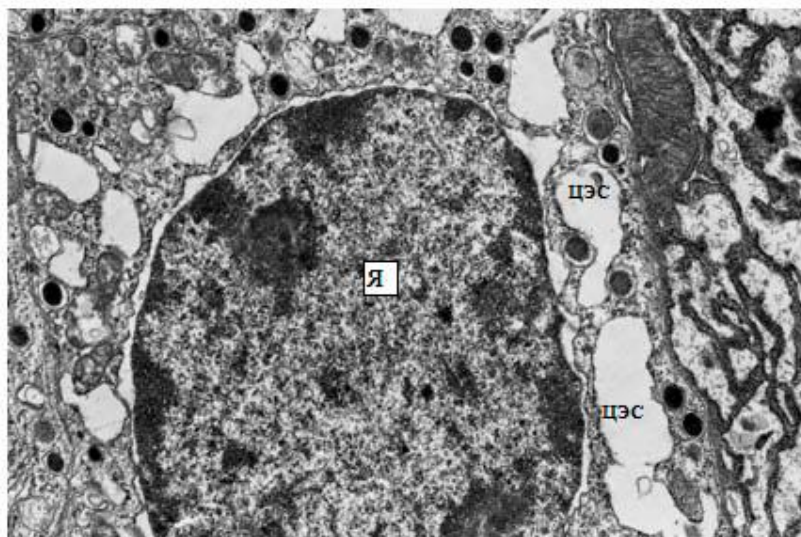
В экспериментальной группе среди клеток железы, имеющих строение, характерное для нормально функционирующего органа, встречались клетки с признаками патологических изменений. Отмечалось расширение перинуклеарного пространства, резкое расширение элементов гранулярного эндоплазматической сети и наличие плотных секреторных гранул (Рис. 2 А). Митохондрии таких клеток имели единичные кристы.

В других клетках, находящихся на гранулярной стадии секреторного цикла, наблюдалось присутствие большого числа гранул разной степени плотности. Мембрана гранул в таких клетках имела сниженную электронную плотность, контуры ее теряли свою четкость и выглядели размытыми (Рис. 2 Б). Целостность мембраны отдельных гранул была нарушена, что сопровождалось выходом их содержимого в цитоплазму клетки. В ряде случаев электронная плотность материала была настолько снижена, что гранулы выглядели оптически пустыми.

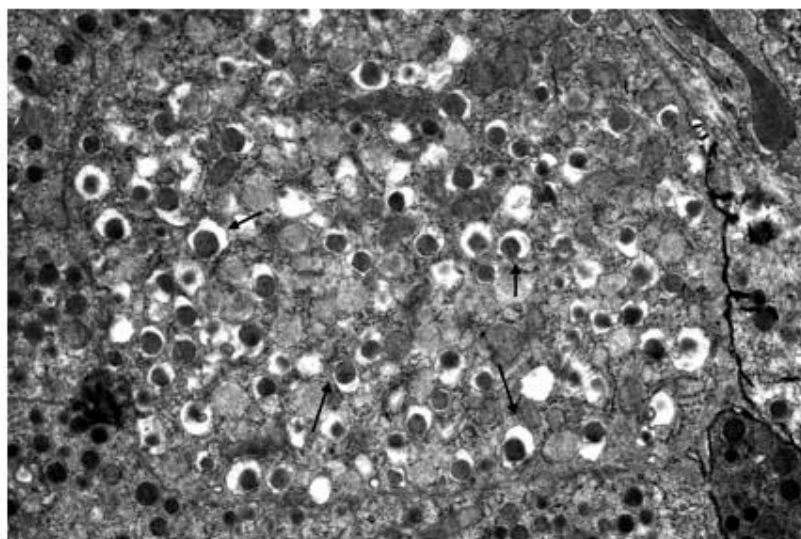
Полученные нами с помощью гистохимических методик данные показывают, что соединения свинца проникают из организма матери в организм плода и нарушают активность ферментов цикла Кребса, транспорт электронов в дыхательной цепи и анаэробный гликолиз в β -клетках поджелудочной железы. Об угнетении функциональной

активности эндокриноцитов свидетельствует также выявление клеток со слаборазвитой эндоплазматической сетью, уменьшенным количеством секреторных гранул, маргинацией хроматина и пикнозом ядер. Подтверждением наших данных могут служить сведения об уменьшении уровня инсулина в крови экспериментальных животных после воздействия солей свинца [3].

В ответ на первичные нарушения гомеостатических параметров в тканях организма развиваются компенсаторно-приспособительные сдвиги. Об их активации свидетельствует увеличение числа лизосомальных ультраструктур, роль которых в процессах клеточной адаптации хорошо известна [7]. Показателем развития адаптационных процессов также является повышение активности СДГ – одного из ферментов цикла Кребса.



А



Б

Рис. 2. Эндокриноцит (β-клетка) панкреатического островка 1,5-месячной крысы (экспериментальная группа). А – расширение перинуклеарного пространства и цистерн эндоплазматической сети; Б – фрагмент цитоплазмы с гранулами. Я – ядро, ЦЭС – цистерны эндоплазматической сети, секреторные β-гранулы обозначены стрелками. х 10000.

К 1,5-месячному возрасту функциональная активность β-клеток поджелудочной железы животных экспериментальной группы, подвергшихся действию ацетата свинца, остается сниженной. Несмотря на развитие компенсаторно-приспособительных процессов,

таких как повышение уровня активности окислительно-восстановительных ферментов и расширение цистерн эндоплазматической сети, в инсулоцитах наблюдаются ультраструктурные изменения, выражавшиеся в повреждениях мембранных структур митохондрий и секреторных гранул.

Согласно литературным данным, при длительной свинцовой интоксикации взрослых крыс наблюдаются увеличение островков Лангерганса и характерные структурные перестройки – клетки в их составе располагаются в виде тяжей, переплетающихся между собой [6]. В наших экспериментах подобные тканевые перестройки не выявлялись.

Изучение литературных источников позволяет сделать вывод о том, что описанные структурно-функциональные изменения эндокринной части поджелудочной железы не являются специфическими для поражения солями свинца. Аналогичные изменения, выражающиеся в повреждении митохондрий, снижении активности окислительно-восстановительных ферментов описаны при фетальном и неонатальном действии никотина [15], а также после систематического действия гравитационных перегрузок [4].

Мы полагаем, что выявляемые структурно-функциональные изменения в клетках эндокринной части поджелудочной железы под действием солей свинца будут предопределять в дальнейшем развитие системных нарушений метаболизма углеводов.

Литература

1. Боголепов, Н. Н. Методы электронномикроскопического исследования мозга / Н. Н. Боголепов. М.: Наука, 1976. 70 с.
2. Влияние свинца на развитие окислительного стресса / И. М. Трахтенберг [и др.] // Токсикол. вестн. 2002. № 3. С. 22–25.
3. Жуйко, Н. В. Содержание инсулина и состояние липидного обмена при воздействии свинца и ограничении двигательной активности / Н. В. Жуйко // Гигиенич. вопросы производства цветных металлов в Казахстане: сб. статей. Алма-Ата, 1987. С.149–152.
4. Захарова, И. В. Структурные преобразования в панкреатических островках после систематического воздействия гравитационных перегрузок / И. В. Захарова // Итог. конф. военно-науч. общества курсантов и слушателей акад.: тез. докл. СПб.: ВМедА, 2002. С. 239–240.
5. Лойда, З. Гистохимия ферментов / З. Лойда, Р. Госсрау, Т. Шиблер. М.: Мир, 1982. 270 с.
6. Окшина, Л. Н. Влияние свинца на состояние функций поджелудочной железы: (Клинико-эксперим. исслед.): автореф. дис. ... канд. биол. наук: 14.00.07 / Л. Н. Окшина; НИИ краев. патологии. Алма-Ата, 1989. 24 с.
7. Структурные основы адаптации и компенсации нарушенных функций / под ред. Д. С. Саркисова. М.: Медицина, 1987. 448 с.
8. Bellinger, D. C. Teratogen update: lead and pregnancy / D. C. Bellinger // Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2005. Vol. 73, № 6. P. 409–420.
9. Chaurasia, S. S. Withania somnifera root extract in the regulation of lead-induced oxidative damage in male mouse / S. S. Chaurasia, S. Panda, A. Kar // Pharmacol. Res. 2000. V. 41. P. 663–666.
10. Eckhardt, W. Regulation of inducible nitric oxide synthase expression in beta cells by environmental factors: heavy metals / W. Eckhardt, K. Bellmann, H. Kolb // Biochem. J. 1999. V. 338, Pt. 3. P. 695–700.
11. Effects of subacute low level lead exposure on glucose homeostasis / E. Whittle [et al.] // Res Commun Chem Pathol Pharmacol. 1983. Vol. 40, № 1. P. 141–154.

12. Ercal, N. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage / N. Ercal, H. Gurer-Orhan, N. Aykin-Burns // *Curr Top Med Chem*. 2001. Vol. 1, № 6. P. 529–539.
13. Fehsel, K. The action of NO and its role in autoimmune diabetes mellitus / K. Fehsel, K. D. Kröncke, V. Kolb-Bachofen // *Res. Immunol*. 1995. Vol. 146, № 9. P. 711–715.
14. Free radicals-induced morphological changes in the pancreas / K. Janicki [et al.] // *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska Med*. 2001. Vol. 56. P. 195–200.
15. 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, Issue 10. e3371.
16. Lidsky, T. I. Lead neurotoxicity in children: basic mechanisms and clinical correlates / T. I. Lidsky, J. S. Schneider // *Brain*. 2003. Vol. 126, Pt. 1. P. 5–19.
17. Release of lead from bone in pregnancy and lactation / W. I. Manton [et al.] // *Environ Res*. 2003. Vol. 92, № 2. P. 139–151.
18. Semczuk, M. New data on toxic metal intoxication (Cd, Pb, and Hg in particular) and Mg status during pregnancy / M. Semczuk, A. Semczuk-Sikora // *Med Sci Monit*. 2001. Vol. 7, № 2. P. 332–340.
19. Valko, M. Metals, toxicity and oxidative stress / M. Valko, H. Morris, M.T. Cronin // *Curr Med Chem*. 2005. Vol. 12, № 10. P. 1161–1208