

© Коллектив авторов, 2012
УДК 612.345:636.7

Л. Г. Никонова, И. Г. Стельникова и В. В. Банин

РЕАКЦИЯ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ СОБАК С НАРУШЕННОЙ ТОЛЕРАНТНОСТЬЮ К ГЛЮКОЗЕ НА ФИЗИЧЕСКИЕ НАГРУЗКИ РАЗЛИЧНОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ

Кафедра нормальной анатомии (зав. — проф. И. Г. Стельникова), ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия»; Научно-исследовательский центр биомедицинских технологий (руков. — академик РАМН проф. Ю. И. Денисов-Никольский), Всероссийский институт лекарственных и ароматических растений Россельхозакадемии, Москва

Целью работы явилось изучение структуры поджелудочной железы у животных с нарушенной толерантностью к глюкозе после воздействия на организм однократной непродолжительной и многократных физических нагрузок. Эксперименты проведены на 26 собаках-самцах в возрасте 2–4 лет, из них 10 составляли контрольную группу. Моделирование воздействия осуществляли в виде бега по ленте тредмилла со скоростью 15 км/ч. Структуру поджелудочной железы исследовали при помощи гистологических, электронно-микроскопических, морфометрических методов. Однократная непродолжительная нагрузка сопровождалась рядом компенсаторно-приспособительных реакций в экзокринной и эндокринной частях железы. Среди них наиболее демонстративны стимуляция и небольшие расстройства локального кровотока в параинсулярных зонах экзокринной части железы, а также признаки, характеризующие интенсификацию синтеза и секреции панкреатических ферментов и инсулина. При многократных физических нагрузках в поджелудочной железе обнаружены расстройства микроциркуляции в экзокринной части железы, отек и локальные повреждения инсулиноцитов. По-видимому, у животных с нарушенной толерантностью к глюкозе многократные физические нагрузки даже умеренной интенсивности могут являться фактором, провоцирующим повреждение.

Ключевые слова: *нарушенная толерантность к глюкозе, поджелудочная железа, экзокриноциты, инсулиноциты, физические нагрузки*

Предиабет, или латентный диабет, в патогенезе которого доминирующее значение принадлежит нарушению толерантности к глюкозе, не имеет отчетливо выраженных клинических симптомов и выявляется в 15–17% случаев по результатам стандартного теста толерантности к глюкозе при профилактических осмотрах или случайно [4, 5, 7]. Очень часто это скрыто протекающее эндокринное нарушение приводит к развитию инсулиннезависимого сахарного диабета, который, по данным Diabetes Association, в структуре заболеваемости населения занимает одно из ведущих мест [16].

Показано, что регулярные физические нагрузки (ФН) у людей с нарушенной толерантностью к глюкозе способствуют нормализации обмена глюкозы и липидов и повышают чувствительность тканей к инсулину [4, 19]. Однако, несмотря на большое количество данных, касающихся биохимических и гормональных изменений в орга-

низме при различных тренировочных режимах [2, 14, 19], в современной литературе практически отсутствуют морфологические подтверждения адаптационных реакций самой поджелудочной железы, благодаря гормональным влияниям, участвующей в регуляции двигательной активности. Можно ожидать, что различные режимы физической активности (интенсивность, продолжительность воздействия) могут по-разному, в том числе неблагоприятно, сказываться на деятельности поджелудочной железы и, соответственно, вызывать ее структурные перестройки.

Цель настоящей работы — изучение морфологических изменений в экзокринной и эндокринной частях поджелудочной железы при действии на организм однократных непродолжительных и многократных систематических ФН у животных с нарушенной толерантностью к глюкозе.

Материал и методы. Работа проведена на 26 беспородных собаках-самцах в возрасте 2–4 лет, содержащихся

Сведения об авторах:

Никонова Лариса Геннадьевна (e-mail: Nikonessa@inbox.ru), *Стельникова Ирина Геннадьевна*, кафедра нормальной анатомии, ГБОУ ВПО Нижегородская государственная медицинская академия, 603005 Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1,

Банин Виктор Васильевич (e-mail: v.banin@mail.ru), Научно-исследовательский центр биомедицинских технологий, Всероссийский институт лекарственных и ароматических растений Россельхозакадемии, 117216 Москва, ул. Грина, 7

в виварии на стандартном рационе питания, предварительно адаптированных к условиям эксперимента, и в соответствии с приказом Минвуза СССР № 742 от 13.11.1984 г. «Об утверждении правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». До начала эксперимента по показателям исходного уровня глюкозы в крови и результатам стандартного теста толерантности к глюкозе были отобраны собаки с нарушенной толерантностью к глюкозе и из них были сформированы 3 группы. 1-я группа — интактный контроль ($n=10$) (без применения нагрузки), 2-я и 3-я — экспериментальные группы: 2-я — с применением однократной нагрузки ($n=10$), и 3-я — с применением многократных систематических воздействий до формирования длительного бега ($n=6$). Для воспроизведения двигательной нагрузки в лабораторных условиях использовали модель бега животных по ленте тредмилла со скоростью 15 км/час, которая соответствует 50% максимальной скорости бега большинства собак. Развитие стадий адаптации к ФН диагностировали в процессе бега по соотношениям частоты сердечных сокращений (ЧСС) и дыхания (ЧД) [1]. Стадии оптимальной нагрузки определяли по стабилизации показателей ЧСС и ЧД на достаточно высоком уровне в течение определенного времени. Среднее время бега составляло $13,2 \pm 1,1$ мин. Продолжение нагрузки приводило к рассогласованию деятельности сердечно-сосудистой и дыхательной систем, что выражалось в дестабилизации параметров. Многократные двигательные нагрузки включали последовательные циклы тренировок до достижения уровня, называемого «пиком работоспособности», на протяжении которого животные выдерживали максимальное время бега за цикл на фоне удовлетворительных показателей соотношения ЧСС и ЧД. Высокий уровень работоспособности у животных с нарушенной толерантностью к глюкозе наступал через 42 ± 3 эпизода нагрузки при индивидуальном разбросе от 39 до 63 тренировок. Продолжительность времени бега составляла 51 ± 5 мин (от 34 до 54 мин у разных животных).

Материал брали под тиопенталовым наркозом (10% раствор тиопентал-натрия на 1 кг массы животного). В условиях управляемого дыхания рассекали переднюю брюшную стенку, извлекали поджелудочную железу, осматривали и взвешивали. Для гистологического исследования материал из хвостовой части железы фиксировали в жидкости Буэна и 10% нейтральном формальдегиде. Парафин — целлоидиновые и парафиновые срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилином—эозином. Для электронной микроскопии кусочки железы фиксировали в 2,5% глutarовом альдегиде, дофиксировали 1% раствором четырёхокси осмия, заливали в эпон — аралдит. Для идентификации панкреатических островков с каждого прицельно заточенного блока получали полутонкие срезы, которые окрашивали метиленовым синим, азуром II или основным фуксином. Ультратонкие срезы контрастировали цитратом свинца и уранилацетатом и изучали в электронном микроскопе HU-12A (Hitachi, Япония) в трансмиссионном режиме. В некоторых случаях электронно-микроскопическое изучение срезов дополняли анализом криофрактографических изображений (метод замораживания — скальвания), позволяющих оценивать состояние межклеточных соединений и иногда общего строения клетки. Для получения расколов замороженной ткани и платино/углеродных реплик поверхностей использовали высоковакуумную напылительную установку BAF-400D (Balzers, Германия). Реплики отслаивали от подлежащей ткани в растворе гипохлорита натрия и серной кислоты, промывали и исследовали в трансмиссионном электронном микроскопе.

Оценку относительных объемов экзокринной и эндокринной частей, экзокринных панкреатоцитов, В-клеток, их ядер и объемной доли секреторных гранул проводили с использованием программы Image Tools 3.0 и системы анализа изображения МАКС 1005 [6]. Цифровой материал обрабатывали с применением методов вариационной статистики с учетом изменчивости признака у каждого животного при использовании стандартных пакетов программ Microsoft Excel 7.0.

Результаты исследования. Поджелудочная железа у контрольных животных характеризуется плотным расположением ацинусов в экзокринной части (рис. 1). Панкреатические островки у животных с нарушенной толерантностью к глюкозе сравнительно невелики и на срезе включают не более нескольких десятков эндокриноцитов. В-клетки занимают, преимущественно, центральное положение в островке. При электронно-микроскопическом исследовании мы обращали внимание, прежде всего, на функциональное состояние экзокриноцитов, расположенных в непосредственной близости от панкреатических островков. Принимая во внимание воротную систему кровоснабжения, при которой фенестрированные капилляры островков, покидая их, включаются в сеть капилляров, кровоснабжающих близлежащие ацинусы, можно ожидать, что именно эти клетки будут реагировать сочетанно с изменениями функциональной активности эндокриноцитов.

Воздействие *однократной непродолжительной нагрузки* у животных с нарушенной толерантностью к глюкозе вызывает развитие компенсаторно-приспособительных перестроек, как в экзо- так и в эндокринной части железы. При внешнем осмотре определяется умеренное полнокровие органа, с чем может быть связано увеличение относительной массы железы на 20% ($P \leq 0,05$). На светооптическом уровне отмечено скопление

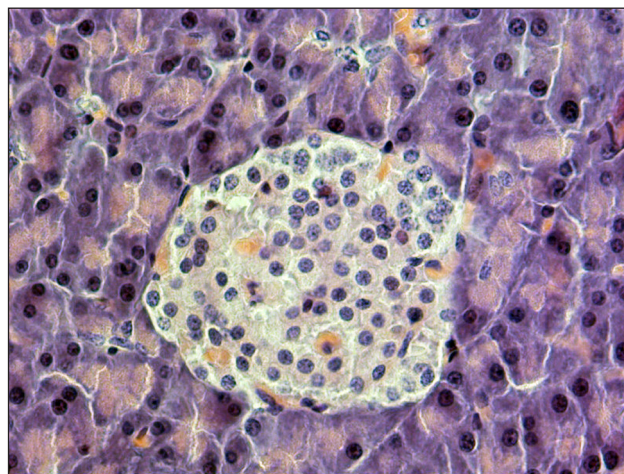


Рис. 1. Поджелудочная железа контрольной собаки. Гематоксалин—эозин. Об. 40, ок. 15.

Таблица 1

Характеристика экзокринной части поджелудочной железы у собак с нарушенной толерантностью к глюкозе ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Показатели	Контроль	При однократной непродолжительной физической нагрузке	При многократной систематической физической нагрузке
Относительный объем, %:			
экзокринной части железы	51,1 $\pm$ 1,6	54,0 $\pm$ 1,4*	53,5 $\pm$ 1,4
периинсулярных панкреатоцитов	17,6 $\pm$ 0,7	18,4 $\pm$ 0,8*	18,1 $\pm$ 0,7
зимогенных гранул	22,8 $\pm$ 0,6	24,1 $\pm$ 0,4*	20,1 $\pm$ 0,4*
ядер экзокринных панкреатоцитов	3,8 $\pm$ 0,3	3,87 $\pm$ 0,24	3,8 $\pm$ 0,3
Ядерно-цитоплазматическое отношение	0,210 $\pm$ 0,021	0,21 $\pm$ 0,03	0,21 $\pm$ 0,03

Здесь и в табл. 2: * различия значимы по сравнению с контролем при $P \leq 0,05$.

форменных элементов крови в междольковых венах и внутридольковых венулах. Нарушение венозного оттока сопровождается некоторыми преобразованиями в экзокринной части железы. Железа выглядит несколько отеочной, междольковые и межацинарные прослойки расширены. Определяется увеличение относительного объема экзокринной части на 5,7% и экзокриноцитов — на 4,5% (табл. 1), при этом размер ядер и ядерно-цитоплазматическое отношение в клетках находятся практически на уровне контрольных значений. Значимо увеличивается объемная доля зимогеновых гранул. Ядра смещены в базальную часть клеток, гипохромны. Панкреатоциты

периинсулярных ацинусов находятся в активном функциональном состоянии, что проявляется на электронно-микроскопическом уровне преобладанием эухроматина в ядре и некоторым отеком кариоплазмы, расширением цистерн гранулярной эндоплазматической сети (рис. 2, а), появлением крупных митохондрий с просветленным матриксом. В цитоплазме этих клеток видны многочисленные зимогенные гранулы, значительная часть которых аккумулирована в перинуклеарной области и в зоне «контакта» с панкреатическими островками (см. рис. 2, б). Округлые компактные скопления белка, напоминающие незрелые гранулы с умеренно электронно-плотным содержимым,

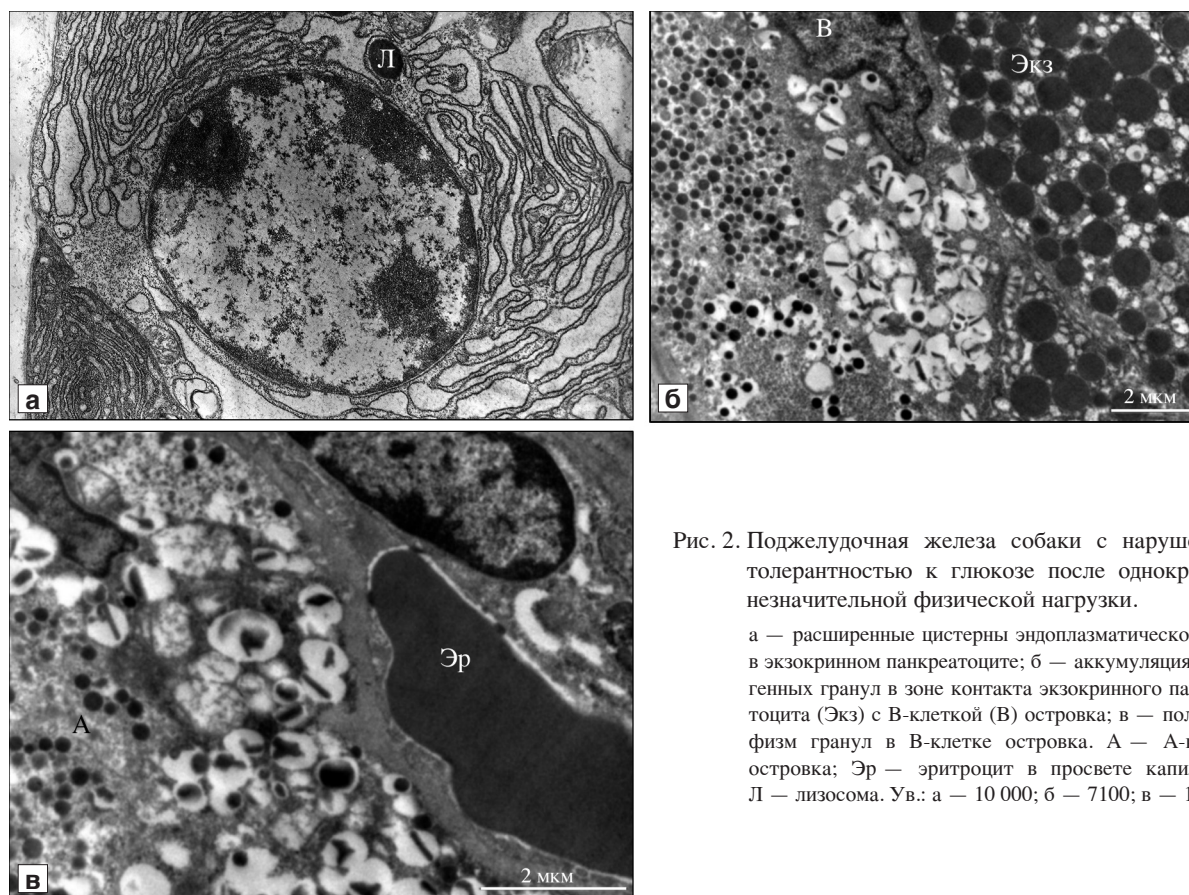


Рис. 2. Поджелудочная железа собаки с нарушенной толерантностью к глюкозе после однократной незначительной физической нагрузки.

а — расширенные цистерны эндоплазматической сети в экзокринном панкреатоците; б — аккумуляция зимогенных гранул в зоне контакта экзокринного панкреатоцита (Экз) с В-клеткой (В) островка; в — полиморфизм гранул в В-клетке островка. А — А-клетка островка; Эр — эритроцит в просвете капилляра; Л — лизосома. Ув.: а — 10 000; б — 7100; в — 11 000.

Таблица 2

Характеристика панкреатических островков и В-клеток у собак с нарушенной толерантностью к глюкозе ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Показатели	Контроль	При однократной непродолжительной физической нагрузке	При многократной систематической физической нагрузке
Относительный объем, %:			
островков	8,8±0,9	7,6±0,4*	9,3±0,6*
В-клеток	6,04±0,18	5,13±0,14*	6,48±0,20
ядер В-клеток	1,11±0,1	1,05±0,08	1,07±0,07
секреторных гранул	15,5±0,6	12,6±0,6*	13,4±0,7*
пустых гранул	0,461±0,020	0,530±0,020*	0,50±0,03*
Ядерно-цитоплазматическое отношение	0,180±0,010	0,20±0,010	0,161±0,010

нередко встречаются в просвете цистерн эндоплазматической сети.

Уменьшение относительного объема панкреатических островков на 14% происходит, преимущественно, за счет снижения объема В-клеток на 15% (табл. 2). Содержимое секреторных гранул В-клеток у собак, так же как у человека, может иметь палочковидную (кристаллоидную) форму или быть округлым, с отчетливо выраженным «галом» на периферии (см. рис. 2, в). При физической нагрузке гранулы часто смещаются к сосудистому полюсу клетки, причем среди них много незрелых (округлых) форм. Увеличивается

количество «пустых» гранул без содержимого, что может свидетельствовать о диффузии содержимого через частично поврежденные мембраны гранул.

Систематические ФН, способствующие формированию длительного бега, вызывают более явные изменения компонентов железы. При внешнем осмотре определяется полнокровие органа. Увеличение весового индекса по сравнению с контролем составляет 35% ($P \leq 0,05$), что превышает значения в 1-й экспериментальной группе на 15%. В просвете некоторых венозных сосудов отмечаются признаки сепарации плазмы, в окружающих

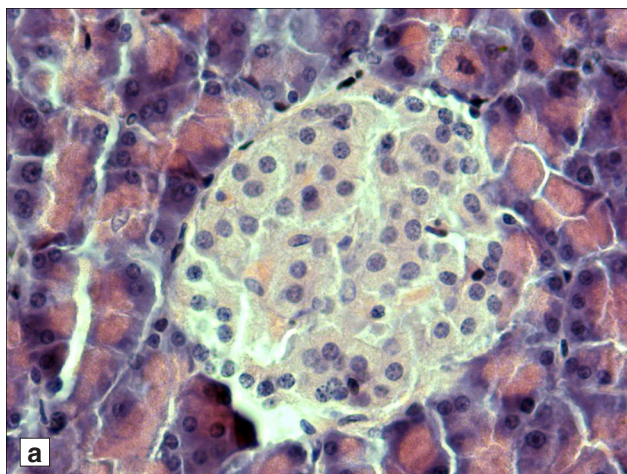
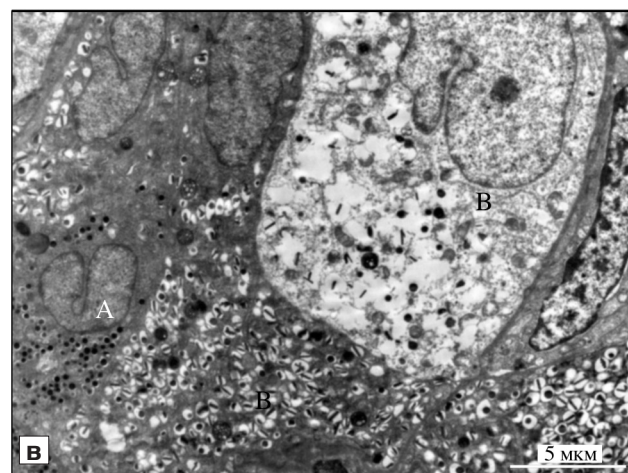


Рис. 3. Поджелудочная железа собаки с нарушенной толерантностью к глюкозе после систематических физических нагрузок.

а — расширенные межацинарные промежутки и умеренный отек панкреатического островка; б — область плотного контакта в апикальной зоне экзокринных панкреатоцитов ацинуса; стрелки — свободные концы контактных «бороздок» на Е-поверхности (Е) плазмолеммы; в — В-клетка с опустошенными гранулами среди сохранных В-клеток. А — А-клетка. а — гематоксилин — эозин; б — метод замораживания — скальвания. а — об. 40, ок. 15; ув.: б — 18 000; в — 3500.



тканях — периваскулярный отек. Междольевые артерии спазмированы. В просвете капилляров как экзо-, так и эндокринной части железы, отмечена агрегация эритроцитов, в окружающей паренхиме — единичные очаги микрогеморрагий. Межацинарные пространства (рис. 3, а) и межклеточные промежутки в ацинусах расширены. Сеть гребешков слияния (или комплементарных им бороздок) в плотных контактах апикальных частей экзокринных панкреатоцитов негустая, с многочисленными «свободными» концами контактных фибрилл (см. рис. 3, б). Зимогенная зернистость в экзокринных панкреатоцитах слабо выражена, в просвете протоков отсутствует секреторное содержимое, что может служить косвенным показателем уменьшения внешнесекреторной функции железы. В цитоплазме экзокринных панкреатоцитов периферических и периинсулярных ацинусов можно нередко видеть расширение цистерн гранулярной эндоплазматической сети и перинуклеарного пространства. По сравнению с тканью железы у животных предыдущей экспериментальной группы в периинсулярных панкреатоцитах снижается объемная доля зимогенных гранул (см. табл. 1), причем значительная часть из них представляют собой незрелые формы со слабо осмиофильным содержимым.

При многократной ФН несколько увеличиваются, по сравнению с контролем, относительные объемы панкреатических островков (см. табл. 2). Границы клеток в панкреатических островках нечеткие, отмечается интерстициальный отек и, возможно, парциальные некрозы эндокриноцитов. Однако, принимая во внимание результаты электронно-микроскопического исследования, мы не расценили это как свидетельство напряжения функциональной активности инсулярного аппарата. В-клетки в пределах одного островка отличались отчетливо выраженным полиморфизмом. Наряду с «темными», сравнительно более осмиофильными клетками, содержащими множество зрелых гранул, нередко встречались В-клетки с явными признаками повреждения — отекая цитоплазма, множество разрушенных «пустых» гранул, дисперсный хроматин (см. рис. 3, в). Такие клетки были более округлыми и крупными и нередко деформировали соседние «темные» эндокриноциты. В периинсулярных зонах иногда встречались так называемые ацино-инсулярные клетки с преобладанием в цитоплазме В-гранул, характерных для эндокриноцитов.

Обсуждение полученных данных. Результаты проведенного исследования демонстрируют различную выраженность адаптационных преобразований в экзо- и эндокринной части

железы у животных с нарушенной толерантностью к глюкозе после воздействия на организм однократной непродолжительной нагрузки и многократных сеансов систематических ФН.

Однократная ФН вызывает непродолжительное перераспределение сосудистого кровотока и некоторое напряжение в системе регуляции потребления глюкозы [17]. У животных с нарушенной толерантностью к глюкозе эти системные процессы сопровождаются структурно-функциональными преобразованиями в поджелудочной железе — некоторым затруднением микроциркуляторного кровотока, умеренным интерстициальным отеком и усиленной секреторной активностью В-клеток панкреатических островков. Это проявляется, в частности, концентрированием секреторных гранул у сосудистых полюсов клеток и выделением в интерстиций незрелых секреторных гранул.

Усиление процессов секреции и накопления секреторных гранул в периинсулярных экзокринных панкреатоцитах, возможно, связано с локальным влиянием инсулина, что согласуется с мнением исследователей, изучавших изменения в фокальных зонах после длительного применения пробиотиков у экспериментальных животных с аллоксановым диабетом [9]. Комплекс морфологических признаков эндокриноцитов свидетельствует о напряжении деятельности клеток островков и, соответственно, о некоторой избыточности даже одиночной ФН. В проводимых нами ранее исследованиях у животных с нормальной толерантностью к глюкозе подобная нагрузка вызывала также усиление функциональной активности А-клеток, что соответствует I стадии ответной гормональной реакции на продолжительную нагрузку [8, 15]. Активное выведение секреторных гранул из В-клеток после данного воздействия косвенно свидетельствует о недостаточном поступлении инсулина в кровь или, возможно, об измененной инсулинорезистентности тканей.

Признаки, характеризующие снижение внешнесекреторной функции железы, связаны, вероятно, с частичной гипоксией органа при тяжелой ФН. Подобные перестройки ранее были показаны в исследованиях поджелудочной железы после хронического воздействия гравитационных перегрузок и в условиях экспериментальной гипоксии [10, 11]. Некоторая дезорганизация структуры плотных контактов в ацинусах также свидетельствует о возможных ишемических повреждениях [18].

Проведенное исследование показало, что даже при отсутствии клинических проявлений недостаточности усвоения глюкозы морфологическое, в

частности, электронно-микроскопическое изучение поджелудочной железы в условиях дозированных ФН полезно не только для оценки адаптационных резервов организма. В этом случае, как и при других, латентно протекающих патологических состояниях, оценка ультраструктурных изменений в реагирующих на воздействие органах может быть методом выбора для анализа клинически неявных патогенетических проявлений [12, 13].

ЛИТЕРАТУРА

- Бирюкова О. В. и Кочетков А. Г. Закономерность адаптации организма млекопитающих к изменяющейся двигательной активности. Научное открытие № 311 (на основании результатов научной экспертизы заявки на открытие № А-386 от 9 февраля 2006 г.). М., 2006.
- Волков Н. И. Биохимия мышечной деятельности. Киев, Олимпийская лит-ра, 2000.
- Демидова Т. Ю. и Галиева О. Р. Профилактика и управление преддиабетическими нарушениями углеводного обмена у больных с метаболическим синдромом. Ожирение и метаболизм, 2007, т. 13, № 4, с. 19–24.
- Джанашия П. Х. и Мирина Е. Ю. Сахарный диабет в практике врача-терапевта. М., Медицина, 2007.
- Древаль А. В. Механизмы нарушения обмена глюкозы у лиц с «преддиабетом». Ожирение и метаболизм, 2009, № 4, с. 23–27.
- Кочетков А. Г., Силин Е. В., Савельев В. Е. и др. Система морфометрического анализа изображения МАКС-1000 в медико-биологических исследованиях. Нижегородский мед. журн., 1999, № 1, с. 54–57.
- Колуэлл Дж. Сахарный диабет. Новое в профилактике и лечении: Пер. с англ. М., Бином, 2007.
- Михайлов С. С. Спортивная биохимия. М., Изд-во «Советский спорт», 2004.
- Обухова Л. А. Влияние длительного приема пробиотика на морфофункциональное состояние эндокринной части поджелудочной железы у экспериментальных животных с аллоксановым диабетом. Бюл. СО РАМН, 2006, т. 120, № 2, с. 173–175.
- Пашенко П. С. и Захарова И. В. Изменения структуры поджелудочной железы после воздействия на организм гравитационных перегрузок. Морфология, 2006, т. 129, вып. 1, с. 62–66.
- Савищев А. В. Ультраструктурная организация поджелудочной железы в условиях изменения кислородного режима. Фундаментальные исследования, 2010, № 7, с. 58–62.
- Саркисов Д. С. Очерки по структурным основам гомеостаза. М., Медицина, 1977.
- Струков А. И., Хмельницкий О. К. и Петленко В. П. Морфологический эквивалент функции (методологические основы). М., Медицина, 1983.
- Хутиев Т. В. Управление физическим состоянием организма. М., Медицина, 2001.
- Bogardus C. Effect of physical training and diet therapy on carbohydrate metabolism in patients with glucose intolerance and NIDD mellitus. Diabetes, 1984, v. 33, p. 311–318.
- Diabetes Association. Diabetes and classification of diabetes mellitus. Diabetes care, 2004, v. 27, (Suppl. 1), p. 15–110.
- Jeon C. Y. Physical activity of moderate intensity and risk of type 2 diabetes. Diabetes Care, 2007, v. 30, p. 744–752.
- Mars J. A. and Molitoris B. A. Ischemia-induced tight junction dysfunction in the kidney. In: Tight Junction (2-nd ed.), Boca Raton a.e., CRC Press, 2001, p. 533–551.
- Toni S. Managing insulin therapy during exercise in type 1 diabetes mellitus. Acta Biomed., 2006, v. 77, p. 34–40.

Поступила в редакцию 16.12.2011
Получена после доработки 30.03.2012

PANCREAS REACTION IN DOGS WITH IMPAIRED GLUCOSE TOLERANCE TO THE PHYSICAL LOADS OF DIFFERENT INTENSITY

L. G. Nikonova, I. G. Stel'nikova and V. V. Banin

The aim of this work was to study the structure of pancreas in the dogs with impaired glucose tolerance exposed to single short and repeated physical loads. The experiments were conducted in 26 male dogs aged 2–4 years, 10 animals formed the control group. The exposure was modeled as a run on treadmill with the velocity of 15 km/hr. The structure of the pancreas was examined using histological, electron microscopic and morphometric methods. Single short-term physical load was accompanied by predominantly compensatory and adaptive changes in both exocrine and endocrine parts of the gland. Among these changes the most significant were the stimulation and some small disturbances of a local blood flow in parainsular areas of the pancreatic endocrine part, as well as some signs indicative of the stimulation of insulin and pancreatic enzyme synthesis and secretion. After repeated physical loads, the pronounced disturbances of the microcirculation were found in the exocrine part of the gland, which were accompanied by insulinocyte edema and local destruction. It is concluded that in the animals with impaired glucose tolerance, the repeated physical loads of even moderate intensity could be the factor provoking tissue damage.

Key words: *pancreas, exocrinocytes, insulinocytes, impaired glucose tolerance, physical loads*

Department of Normal Anatomy, Nizhny Novgorod State Medical Academy; Scientific Research Center of Biomedical Technologies, Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants, Russian Academy of Agriculture, Moscow