

На правах рукописи

КУРЧ НАТАЛЬЯ МИХАЙЛОВНА

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ
РАЗВИТИЯ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У КРЫС,
АЛКОГОЛИЗИРОВАННЫХ В ПРЕНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ**

03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Томск – 2004

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении «Омском государственном педагогическом университете» Министерства образования Российской Федерации

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Мкртчян Офелия Заверовна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Ильинских Николай Николаевич

доктор биологических наук, профессор
Кривова Наталья Андреевна

Ведущая организация: Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Тюменская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «__» _____ 2004г. в __ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.03 при Сибирском государственном медицинском университете по адресу: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Сибирского государственного медицинского университета.

Автореферат разослан «__» _____ 2004г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



А.В.Герасимов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Одной из фундаментальных проблем современной биологии является исследование закономерностей гисто- и органогенеза, его регуляций в условиях целостного организма, влияние повреждающих факторов и разработка средств и методов коррекции вызванных этими факторами изменений. И в этой большой проблеме важное место принадлежит исследованию пренатальной этаноловой интоксикации на общебиологические закономерности постанатального органогенеза и функциональную морфологию органов и тканевых систем.

Экспериментальные исследования показали, что в основе развития алкогольного синдрома плода, возникающего при употреблении алкоголя во время беременности, лежит токсическое действие алкоголя и продуктов его распада (ацетальдегида и др.) на развивающийся организм. Этому способствует легкая проходимость алкоголя через плаценту. При этом его концентрация в крови плода соответствует таковой в крови матери (Вегхейн П.В., Лейтнер Я., 1981). Играет роль также отсутствие алкогольдегидрогеназы в печени зародыша и плода, подавление синтеза РНК, развитие алкогольной гипогликемии, нарушение трансплацентарного транспорта эссенциальных аминокислот, цинка и др. (Таболин В.А., Урывчикова Г.А., 1986). Кроме того, этанол и ацетальдегид, попадая в кровеносное русло плода вызывают активацию свободно-радикальных процессов (Ерохова З.Н., Боженков Ю.А., 1997). Образующиеся при этом активные формы кислорода повреждают клеточные мембраны, обеспечивая цитотоксический эффект (Henderson G.I. et al., 1995). Считается, что именно процессы активации свободно-радикального окисления лежат в основе реализации токсических эффектов этанола на эмбрион и плод.

Получены экспериментальные данные, подтверждающие прямое влияние этанола на структурные компоненты поджелудочной железы, состояние ее внутренней и внешней секреции (Луцевич Э.В., Чепеленко Г.В., 2001; Vraganza J.M., 1996). Выявлена роль окислительного стресса в развитии алкогольного панкреатита (Минушкин О.Н., 2001; Сторожок С.А. и соавт., 2001; Sarles H., 1986; Schulz H.U. et al., 1999). Изучено протективное действие некоторых видов антиоксидантов при алкоголизме (Канапацкая И.А. и соавт., 1997; Ланкин В.З. и соавт., 1999; Сидоров П.И. и соавт., 2000; Панышин Г.А. и со-

авт., 2000; Черданцев Д.В. и соавт., 2002; Glascott Peter A. et al., 1996; Subirade I. et al., 1996; Polideri M.C., Frei B., 1998).

Однако сведений о пренатальном влиянии этанола на экзокринную и эндокринную части поджелудочной железы крайне недостаточно. Кроме того, выяснение эффективности применения комплекса аминокислот и витаминов могут лечь в основу разработки профилактических мер для коррекции нарушений, вызванных употреблением алкоголя во время беременности.

Работа выполнена в рамках НИР кафедры общей биологии и МПБ, проводимой по федеральному плану на тему: «Действие повреждающих факторов на организм и его развитие на тканевом, клеточном и субклеточном уровне» (№ гос. регистрации 01910011014).

Цель исследования:

Выявить морфофункциональные изменения показателей развития поджелудочной железы у потомства крыс, алкоголированного в пренатальном периоде, и определить эффективность антиоксидантов при данных условиях.

Задачи:

1. Установить влияние пренатальной алкогольной интоксикации на показатели роста массы тела потомства и массы поджелудочной железы в различные сроки постнатального онтогенеза (две недели, один месяц, два месяца).

2. Выявить изменение структур экзокринной части поджелудочной железы у пренатально алкоголированного потомства в различные сроки постнатального онтогенеза.

3. Исследовать характер структурных изменений в эндокринных компонентах поджелудочной железы под действием пренатальной алкогольной интоксикации у пренатально алкоголированного потомства в различные сроки постнатального онтогенеза.

4. Выявить влияние алкогольной интоксикации на уровень глюкозы и С-пептида, а также на активность α -амилазы у потомства алкоголированных самок.

5. Оценить протективный эффект при использовании комплекса аминокислот – глутамата натрия, глицина, метионина и антиоксидантных витаминов - токоферола, ретинола и аскорбиновой кислоты у потомства алкоголированных крыс.

Научная новизна

Впервые на экспериментальном материале установлено влияние пренатальной алкогольной интоксикации на тканевые структуры поджелудочной железы. Выявлены структурные, морфометрические

и биохимические отклонения в поджелудочной железе у пренатально-алкоголизированного потомства в различные сроки постнатального онтогенеза с изменением характера корреляций. Показана роль сосудистых нарушений в развитии деструктивных изменений в железе. Установлен характер реактивных изменений экзокринной и эндокринной частей органа на внутриутробный контакт с алкоголем.

Выявлено протективное действие комплекса аминокислот-предшественников глутатиона и антиоксидантных витаминов для коррекции полученных в эксперименте отклонений в развитии и функциональной морфологии поджелудочной железы.

Научно-практическая значимость

Полученные экспериментальные данные углубляют и расширяют имеющиеся сведения о закономерностях развития поджелудочной железы и о влиянии повреждающего действия этаноловой интоксикации на становление и функциональную морфологию органа. Выявлено отдаленное повреждающее действие алкоголя, вводимого во внутриутробном периоде, на морфофункциональные показатели поджелудочной железы. На основании проведенного исследования выявлен комплекс антиоксидантов с наиболее выраженным протективным действием в отношении поджелудочной железы при воздействии алкоголя.

Теоретические положения работы применяются в учебном процессе на кафедре общей биологии и МПБ, на кафедре экологии Ом ГПУ, а также кафедре биохимии, на кафедре гистологии и эмбриологии и кафедре медицинской биологии с основами генетики ОГМА.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Пренатальная алкогольная интоксикация у крыс вызывает нарушение развития и функциональной морфологии поджелудочной железы, проявляющиеся в изменении структуры как экзокринной части органа (ацинусы и выводные протоки), так и его островкового аппарата.

2. Морфологические изменения поджелудочной железы сопровождаются нарушением гормональной и ферментативной функции органа.

3. Применение антиоксидантов оказывает протективный эффект на процессы развития поджелудочной железы в постнатальном периоде.

Апробация работы

Материалы диссертации доложены на VI конгрессе международной ассоциации морфологов (Уфа, 2002), на конференции

«Актуальные вопросы экспериментальной и клинической морфологии» (Томск, 2002), на Всероссийской конференции «Проблемы медицинской энзимологии» (Москва, 2002), на конференции «Молекулярные механизмы типовых патологических процессов» (Санкт-Петербург, 2003), на Всероссийской научной гистологической конференции «Реактивность и пластичность гистологических структур в нормальных, экспериментальных и патологических условиях» (Оренбург, 2003), на межрегиональной конференции биохимиков Урала, Западной Сибири и Поволжья «Биохимия: от исследования молекулярных механизмов – до внедрения в практику и производство» (Оренбург, 2003), на V межрегиональной конференции «Актуальные вопросы наркологии» (Омск, 2004), на Всероссийской научной конференции «Морфологические науки – практической медицине», посвященной памяти А.А.Никифоровой (Омск, 2004), на заседании научно-методического семинара Омского государственного педагогического университета «Актуальные вопросы биологии и химии» (Омск, 2004), на заседании Омского отделения ВНО АГЭ (Омск, 2004).

Объем и структура диссертации

Работа изложена на 148 страницах машинописного текста, содержит 8 таблиц, 64 рисунка и состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной материалам и методам исследования, трех глав собственных исследований, обсуждения полученных результатов и выводов. Библиографический указатель содержит 170 отечественных и 97 иностранных источников литературы.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Экспериментальное исследование выполнено на 304 неполовозрелых потомках белых беспородных крыс в различные сроки постнатального онтогенеза. Эксперимент проводился в осенне-зимний период 2001-2003 гг. Содержание, уход и кормление животных производилось в соответствии с рекомендациями (Лоскутова З.Ф., 1980; Западнюк И.П. и соавт., 1983). Выведение животных из эксперимента производилось в утренние часы декапитацией под эфирным наркозом после 24-часового голодания (Копаладзе Р.А., 2000).

С целью изучения действия пренатальной этаноловой интоксикации на развитие поджелудочной железы потомства взрослых половозрелых самок массой 180-200 г подвергали алкогольной интокси-

кации путем ежедневного интрагастрального введения 40% раствора этанола в дозе 4 г/кг массы (Abel E.L. et al., 1984; Henderson G.I. et al., 1995) с момента спаривания до рождения потомства (Mankers R.F. et al., 1982). Контрольные животные получали эквивалентное количество физиологического раствора.

Для определения протекторного действия антиоксидантов на фоне алкогольной интоксикации часть самок получали дополнительно к этанолу комплекс аминокислот – глутамат натрия-50 мг/100 г (Новоселова Н.Г., 1983), метионин-70 мг/кг (Padvanabhan R., Ibrahim A., 1997), глицин-1 мг/кг (Шевелева Г.А. и соавт., 1995). Другие самки дополнительно получали комплекс витаминов – α -токоферол-80 мг/кг, ретинол-1 мг/кг, аскорбиновую кислоту-200 мг/кг (Канапацкая И.А. и соавт., 1997).

Материал для гистологического и биохимического исследования забирался у потомства в возрасте 15-ти, 30-ти и 60-ти суток (табл. 1).

Во всех пометах крыс производился подсчет живых родившихся крысят, мертворожденных, численность крысят в помете, а также летальность.

Таблица 1

Количество животных, использованных в эксперименте по моделированию антенатальной алкогольной интоксикации

	Кон- троль	Алко- голь	Алко- голь+АК	Алко- голь+вит
15 суток	30	40	15	15
30 суток	30	38	15	13
60 суток	35	30	10	13
Всего	95	108	40	41

При заборе поджелудочной железы производилось ее взвешивание. Фиксацию производили в 10% растворе формалина, жидкости Буэна. Кусочки фиксированной поджелудочной железы после проводки заливали в парафин (Меркулов Г.А., 1961). Далее на ротационном микротоме производились срезы толщиной 5 мкм. Срезы для обзорной микроскопии окрашивали гематоксилин-эозином (Ромейс Б., 1953). Для дифференциальной окраски А- и В-клеток срезы окрашивали альдегид-фуксином по Габа в модификации Дыбана (Фалин Л.И., 1964). Для окраски соединительнотканых компонентов железы применяли окраску по Ван-Гизон (Хонин Г.А., 2004). Морфометрическое исследование производилось при помощи светового микроскопа фирмы «Reichert», винтового окуляр-микрометра МОВ-

1-15x (объектив x40, x90) (Автандилов Г.Г., 1973, 1984, 1990, 2002; Ташкэ К., 1980). Произведено морфометрическое исследование следующих показателей: объем ацинусов поджелудочной железы, объем ядер экзокриноцитов, объем ядер эндокриноцитов А и В, диаметр эндокринных островков, соотношение В- и А-клеток в островках, среднее количество клеток в ацинусе, толщина междольковой соединительнотканной прослойки. Всего изучено 485 гистологических препаратов.

Для оценки функционального состояния поджелудочной железы полученного потомства определяли уровень глюкозы, активность α -амилазы, содержание С-пептида в сыворотке крови животных. Уровень глюкозы определяли стандартным набором «Глюкоза – ФКД» глюкозооксидазным методом. Активность α -амилазы определяли с помощью набора «КлиниТест- α -амилаза» амилотест-системой по Каравею. Содержание С-пептида в сыворотке крови животных определяли методом РИА при помощи набора «С-PEPTIDE RIA СТ» фирмы «ZenTech» (Бельгия) на базе ЦНИЛ ОГМА (зав. лабораторией – доктор медицинских наук Т.И.Долгих).

Полученные результаты подвергнуты статистической обработке. Определяли среднее арифметическое значение (M), стандартное отклонение среднего значения (s) и ошибку среднего (m). Статистическую значимость различий оценивали по t-критерию Стьюдента. Различия величины считали статистически значимым при $p < 0,05$ (Лакин Г.Ф., 1990; Петри А., Сэбин К., 2003).

Для получения информации о тесноте связи между двумя количественными признаками производился расчет коэффициента линейной корреляции Пирсона. Качественная оценка тесноты связи производилась согласно В.И.Юнкерову и С.Г.Григорьеву (2002): при $r < 0,3$ – как слабая; при $0,3 \leq r \leq 0,5$ – умеренная; при $0,5 \leq r \leq 0,7$ – заметная; при $0,7 \leq r < 0,9$ – сильная.

Результаты собственных исследований и их обсуждение

Пренатальная интоксикация этанолом оказывает выраженное влияние на развитие потомства в постнатальном онтогенезе. Об этом свидетельствуют высокие показатели летальности у алкоголизированных крыс, а также в случаи мертворожденности (табл.2).

Среднее количество крысят в помете в данной группе статистически значимо ниже на 25,91% по сравнению с контрольными животными. Показатели летальности в группах с коррекцией антиоксидантами в несколько раз меньше, хотя и превышают данный показатель у контрольных животных.

Таблица 2

Показатели летальности в экспериментальных группах				
Показатель	Контроль	Алкоголь	Алк+АК	Алк+вит
Количество родившихся крысят	95	132	43	43
Количество выводков	15	27	8	7
Среднее кол-во крысят в помете	6,3±0,4	4,9±0,5 (p<0.05)	5,4±0,9	6,1±0,2
Летальность, %	1,05	14,28	7,50	4,65
Мертворожденность, %	-	4,55	-	-

О токсических эффектах химического вещества на потомство прежде всего судят по дефициту массы тела, которая, как правило, сопряжена с массой органа-мишени (Колесников С.И. и соавт., 1999). Масса алкоголизованных крыс значительно меньше контроля в 1-месячном и 2-х месячном возрасте. В группах с коррекцией антиоксидантами значимых отличий по массе тела от контроля не имелось. Данное явление объясняется влиянием этанола на синтез клеточной РНК, состояние клеточных мембран, деление и рост клеток (Henderson G.I., 1995). Имеются данные о том, что этанол подавляет белоксинтезирующие процессы в тканях плода (Shibey I.A. et al., 1997). Все это предопределяет дефицит массы тела при алкогольной интоксикации. Масса поджелудочной железы у пренатально алкоголизованных животных значительно снижена во все сроки эксперимента (рис.1).

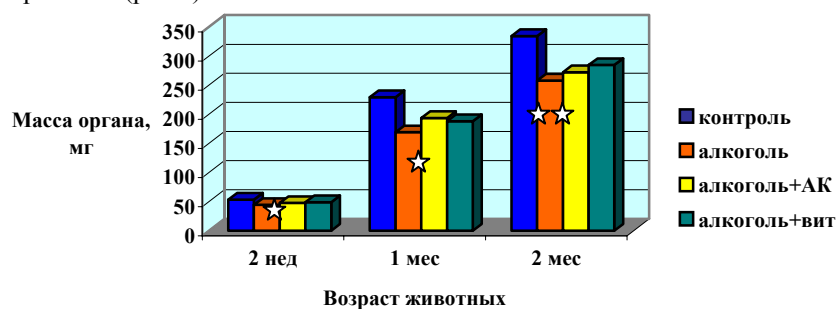


Рис.1. Показатели массы поджелудочной железы в различные сроки эксперимента (☆ p<0.001).

У животных, подвергнувшихся пренатальной алкогольной интоксикации в 2-х недельном возрасте обнаруживаются значительные изменения как в экзокринной части железы, так и в эндокринной ее части. Гистологическая картина характеризовалась выраженными морфологическими изменениями подобными тем, какие обнаруживались у больных с хронической алкогольной интоксикацией (Пауков Е.С., Ерохин Ю.А., 2001). Ацинусы неправильной формы, не определялась четкая граница между зимогенной и базофильной зонами клетки. В клетках гранулы зимогена разрежены, ядра приближены к базальной мембране. В краевых отделах долек наблюдались явления дисконплексации ацинусов. Клетки в них становились вакуолизированными с гипрехромными или пикнотичными ядрами. Внутريدольковые и междольковые протоки дилатированы, в просвете виден слущенный эпителий. Эпителий протоков уплощен.

Проявились характерные для алкогольной интоксикации изменения со стороны сосудистого русла поджелудочной железы. Известно, что этанол вызывает нарушения в макро- и микроциркуляторном русле, ухудшает реологические свойства крови (Винник Ю.С. и соавт., 2000). В нашем случае у подопытных крыс венозные сосуды расширены, полнокровны. Периваскулярные пространства часто инфильтрированы клетками системы мононуклеарных фагоцитов. Изменение проницаемости стенок сосудов обуславливает пропотевание жидкой части крови и форменных элементов в интерстициальное пространство. Именно с этим мы связываем отек междольковой соединительнотканной прослойки, толщина которой у алкоголизируемого потомства больше контрольных значений почти в 2 раза (рис. 2).

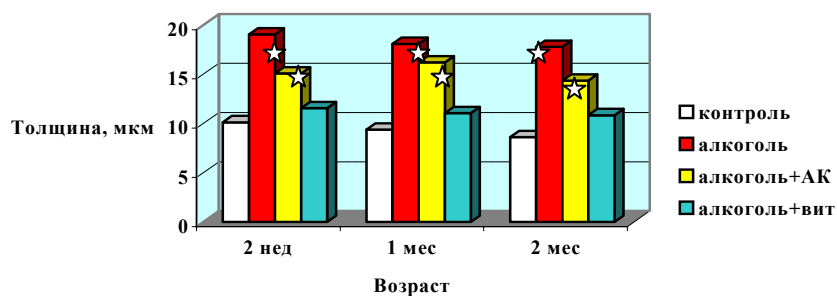


Рис. 2. Показатели толщины междольковой соединительнотканной прослойки (☆ $p < 0.001$).

Морфометрические показатели у 2-х недельных алкоголизованных крыс свидетельствуют об атрофических изменениях ацинусов. Объем ацинусов и объем ядер экзокриноцитов был значимо меньше на 20,45% и 13,01% соответственно, чем в контрольной группе (рис.3).

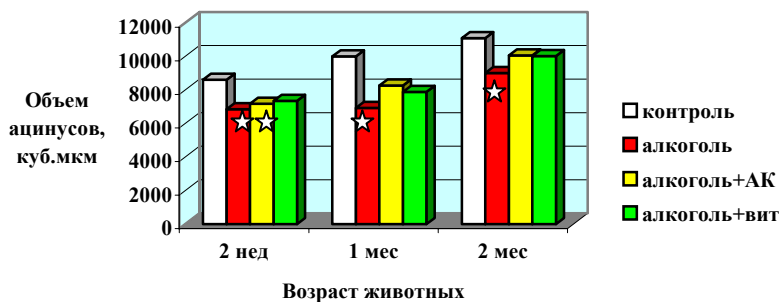


Рис.3. Показатели объема ацинусов у экспериментальных животных в различные сроки эксперимента (☆ $p < 0.001$).

Выявленные изменения совпадают с мнением исследователей о том, что этанол вызывает атрофические изменения в паренхиме поджелудочной железы (Садоков В.М., 1992; Махов В.М., 2000).

Некоторые изменения коснулись и эндокринной части поджелудочной железы. Выявлено значимое уменьшение диаметра островков Лангерганса, а также объема ядер А- и В-клеток по сравнению с контрольной группой (рис.4).

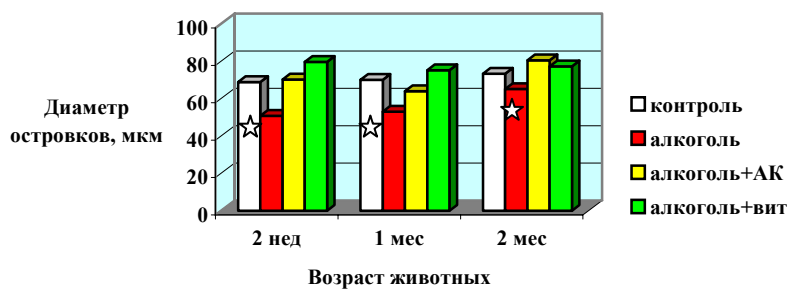


Рис. 4. Показатели диаметра эндокринных островков в различные сроки эксперимента (☆ $p < 0.001$).

Вызывает интерес изменение соотношения А- и В-клеток в островках. По мнению И.П.Мухамедовой (1996) изменение соотношения островковых клеток является признаком реакции эндокринного аппарата поджелудочной железы на действие повреждающих факторов. У алкоголизованных крыс в 2-х недельном возрасте происходит изменение соотношения в островке эндокриноцитов в сторону уменьшения количества А-клеток.

Сходная картина наблюдается у алкоголизованных животных в возрасте 1-го месяца. Масса тела и масса железы меньше контрольных значений. Сохраняются изменения в строении поджелудочной железы. Изменения эти носят мозаичный характер: наряду с участками с нормальной морфологической картиной, имелись участки с изменениями. Чаще в краевых участках долек отмечены зоны, в которых ацинусы утратили нормальное строение. Они дисконфлексированы, границы клеток не дифференцируются. Гранулы зимогена имеют диффузное расположение, теряется зональность в ацинарных клетках. Ядра пикнотичны. Внутридольковые и междольковые протоки расширены, в просвете их густой секрет. Стенка деформирована, эпителий уплощен. Отмечаются изменения со стороны сосудов: они расширены, полнокровны. Обнаруживаются участки с периваскулярной и периневральной инфильтрацией.

Сохраняются статистически значимые различия с контролем ряда морфометрических показателей. Объем ацинусов и объем ядер экзокринных клеток значимо меньше контрольных значений на 30,65% и 10,80% соответственно (рис.3). Толщина междольковых соединительнотканых прослоек больше контрольных в 1,92 раза, что позволяет говорить о сохраняющемся отеке интерстиция (рис.2). Эндокринные островки у пренатально алкоголизованных крыс имеют значимо меньший диаметр на 24,52% по сравнению с контролем (рис.4). Значимо уменьшен объем ядер А- и В-клеток на 21,07% и 19,28% соответственно.

У половозрелых крыс в возрасте 2-х месяцев сохраняются статистически значимое уменьшение объема ацинусов и объема ядер экзокриноцитов, диаметра островков (рис.3,4). Почти в 2 раза превышает контрольные показатели толщина соединительнотканной прослойки (рис.2). Объем ядер эндокриноцитов сохраняют статистически значимые отличия: у А- и В-клеток они меньше на 24,03% и 27,27% соответственно. Обнаруживаются участки с периваскулярной, периневральной и перидуктальной инфильтрацией. Изменения со стороны внутридольковых и междольковых протоков прогресси-

руют. Стенки протоков деформируются, утолщаются, эпителий уплощен, в отдельных участках десквамирован. Вены дилатированы, полнокровны. Отмечается пристеночное стояние лейкоцитов.

Описанные нами изменения могут быть результатом повреждающего воздействия этанола во внутриутробном периоде, о чем свидетельствуют и многочисленные данные литературы (Медведева В.С., 1989; Коннор П., Стрейсгус А., 1999). Но, кроме того, считается, что нарушение кровообращения оказывает негативное влияние на сами ацинарные клетки, так как сопровождается развитием гипоксии (Винник Ю.С. и соавт., 2000). В условиях гипоксии и окислительного стресса нарушается развитие поджелудочной железы во внутриутробном периоде, что проявляется нарушением ее структуры. Об этом свидетельствуют экспериментальные данные нашего исследования.

Показатели уровня глюкозы в крови, полученные нами при моделировании алкогольной интоксикации крыс во внутриутробном периоде, выявили гипогликемическое действие этанола во все сроки эксперимента (рис.5).

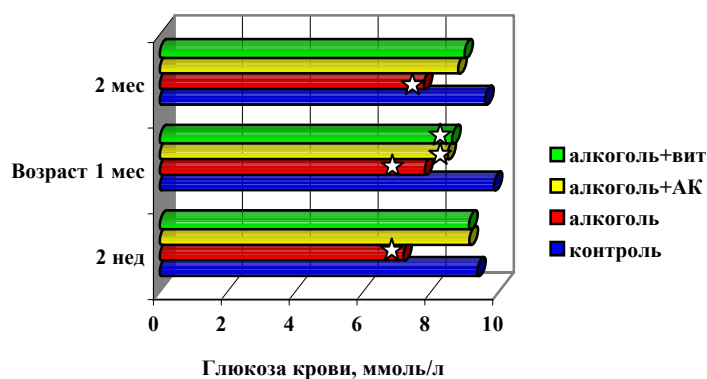


Рис.5. Показатели уровня глюкозы сыворотки крови в различные сроки эксперимента (* $p < 0,001$).

Общеизвестно влияние этанола на углеводный обмен в организме (Palmer T.N., 1991; Gordon G.G., Lieber C.S., 1992; Бокарев И.Н. и соавт., 1999). Уровень глюкозы косвенно отражает состояние островкового аппарата. Однако имеется две диаметрально противоположные точки зрения о влиянии алкоголя на уровень глюкозы.

Некоторые авторы обнаруживают падение уровня глюкозы лишь при острой алкогольной интоксикации, а при хронической напротив – гипергликемию (Махов В.М. и соавт., 2000; Shan J.H., 1988). Объясняют они повышение уровня глюкозы в крови алкоголиков снижением реактивности организма на инсулин, что является причиной непереносимости глюкозы (Gordon G.G., Lieber C.S., 1992). Кроме того, ряд авторов связывают это явление с повышением уровня глюкагона и других гормонов, отвечающих за повышение уровня глюкозы в крови (Adams M.A., Hirst M., 1984).

Другие авторы считают, что этанол вызывает гипогликемию в начальных стадиях алкоголизации, связывая этот эффект с ингибированием процессов глюконеогенеза (Palmer T.N. et al., 1991; Silver Scott Q., 1998). По данным С.Ю.Абрикосовой и соавт. (1986), при регулярном приеме этанола истощается запас гликогена в печени, нарушается гликогенолиз, ресинтез глюкозы. Полученные нами данные подтверждают мнение исследователей о гипогликемическом влиянии этаноловой интоксикации.

С целью характеристики эндокринной функции поджелудочной железы в ходе эксперимента в крови экспериментальных животных также определяли уровень С-пептида как маркера продукции инсулина. При хронической алкогольной интоксикации предпочтительнее определять уровень С-пептида, так как в пораженной этанолом печени нарушаются процессы деградации инсулина и при этом определение уровня инсулина не будет достоверно отражать функцию островкового аппарата (Винокурова Л.В., 1990; Тишенина Р.С., Богатырев О.П., 1996).

В нашем эксперименте у потомства в двухнедельном возрасте наблюдалось значимое увеличение уровня С-пептида, что свидетельствует о повышенной секреции инсулина (рис.6). Интересно, что именно в этот период изменяется соотношение эндокринных клеток в островках в сторону увеличения В-клеток и уменьшения А-клеток. В дальнейшем уровень С-пептида у алкоголизованных крыс падает и приближается к контрольным значениям. Уменьшается и процентное содержание в островках В-клеток. Имеются данные о более выраженной чувствительности А-клеток к действию повреждающих факторов по сравнению с В-клетками (Мухамедова И.П., 1996).

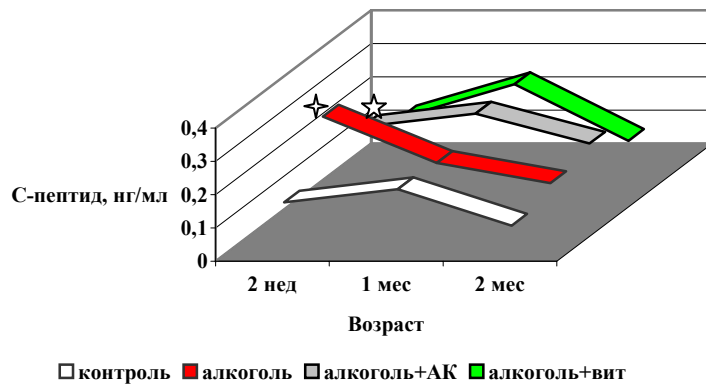


Рис.6. Показатели уровня С-пептида в сыворотке крови экспериментальных животных в различные сроки эксперимента (✦ $p < 0,001$; ☆ $p < 0,05$).

Для выявления феномена «уклонения» ферментов в кровь нами производилось определение активности α -амилазы. Повышение уровня α -амилазы в крови связывают с деструкцией клеток паренхимы органа, повышением внутрипротокового давления (Губергриц Н.Б. и соавт., 1999). Анализ полученных данных показывает, что активность α -амилазы у алкоголизируемого потомства значимо выше контрольных показателей во все сроки наблюдения (рис.7).

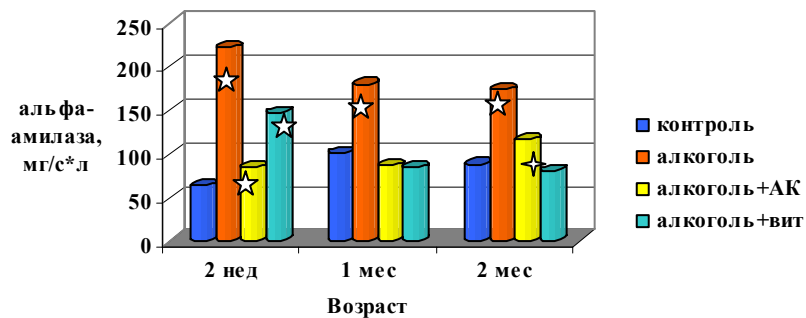


Рис.7. Активность альфа-амилазы сыворотки крови в различные сроки эксперимента (✦ $p < 0,05$; ☆ $p < 0,001$).

Таким образом, пренатальная алкогольная интоксикация вызывает ряд морфофункциональных изменений в поджелудочной железе. Эти изменения затрагивают как экзокринную, так и эндокринную части органа и выражаются в поражении микрососудистого русла, протоковой системы, деструкции ацинусов, отеке и инфильтрации соединительнотканной стромы. Морфометрические исследования выявили уменьшение ацинусов, диаметров островков, изменение соотношения островковых клеток в некоторых возрастных периодах. Биохимические исследования выявляют повышенную активность α -амилазы, гипогликемию, изменение синтеза С-пептида в ранние сроки. Судя по полученным результатам, описанные изменения в поджелудочной железе, полученные в результате перенесенного внутриутробного контакта с этанолом, инициированные еще в эмбриогенезе, сохраняются на этапах постнатального развития. Данный факт позволяет говорить об отдаленных последствиях пренатальной алкоголизации по отношению к поджелудочной железе, ее развитию и функциональной морфологии.

При проведении эксперимента исследовалась эффективность применения некоторых антиоксидантов для коррекции нарушений, возникающих в поджелудочной железе в результате воздействия этанола. В качестве антиоксидантов был использован комплекс аминокислот – метионина, глутамата натрия, глицина, являющихся предшественниками глутатиона. Глутатион играет важную роль в обезвреживании многих токсических соединений, в том числе активных форм кислорода (Кулинский В.И., Колесниченко Л.Л., 1990). При хронической алкоголизации пул восстановленного глутатиона истощается (Петрова Л.Л., Труфанова Л.В., 1998). Н.Л.Самусева в своих экспериментах по моделированию пренатальной алкогольной интоксикации обнаружила сниженный уровень глутатиона у потомства в различные сроки наблюдения (Самусева Н.Л., 2002). Взаимосвязь активности процессов СРО и уровнем восстановленного глутатиона подтверждена экспериментально (Фонякова О.Г., 1996; Высокогорский В.Е., Самусева Н.Л., 2001). Приведенные факты послужили основанием для совместного применения с этанолом комплекса аминокислот в качестве антиоксиданта.

Применение комплекса аминокислот на фоне алкоголизации способствовало снижению уровня смертности – летальность в данной группе ниже, чем у алкоголизированных крыс почти в 2 раза (табл.2). Отмечен более высокий показатель среднего количества крысят в помете. Отсутствуют мертворожденные животные. Масса

тела и масса поджелудочной железы не имела значимых различий с контролем (рис.1).

У животных данной группы в возрасте 2-х недель морфометрические показатели были несколько лучше в сравнении с животными, получавшими один этанол. Диаметр островков, объем ядер экзокринных и эндокринных клеток, соотношение А- и В-клеток не имели статистически значимых отклонений от контроля (рис.4). Однако сохраняются признаки отека интерстиция железы и уменьшение объема ацинусов (рис.2,3). Среди участков с сохраненной структурой имели место очаги деструкции ткани железы, проявляющиеся дисконкомплексацией ацинусов, потерей четкого разграничения между базальной и апикальной зонами клеток, пикнозом их ядер. В некоторых случаях ацинарная ткань принимала вид симпласта. Но при этом не обнаружено выраженных изменений со стороны протоков железы.

При достижении животными возраста одного месяца морфометрические показатели в возрасте 1-го месяца приблизились к контрольным значениям и не имели от них статистически значимых отличий, кроме толщины междольковых прослоек – данный показатель превышал контрольный в 1,5 раза (рис.2). Очаги деструкции сохраняются. Как правило, они располагаются в краевых отделах долек паренхимы железы рядом с неизменной ацинарной тканью. Как и в 2-х недельном возрасте характерной чертой были потеря дифференцировки границ ацинарных клеток, диффузное расположение гранул зимогена, гиперхромность и пикноз ядер.

В 2-х месячном возрасте у животных, получавших аминокислоты, сохраняются признаки отека интерстиция железы (рис.2). В этом возрасте впервые проявляются особенности со стороны эндокринного аппарата в виде изменения соотношения островковых клеток в сторону уменьшения количества А-клеток. При этом объем ядер В-клеток имеет статистически значимые различия с контрольными значениями. Остальные морфометрические показатели не имели значимых отличий от контрольных. (рис. 3,4). Продолжают сохраняться участки с измененной структурой, которые характеризуются дисконкомплексацией ацинусов, потерей клеточных границ. Из-за этого ацинусы выглядят как симпласт. Отмечается разреженность гранул зимогена, гиперхромность ядер.

При определении уровня глюкозы в крови животных, получавших совместно с этанолом комплекс аминокислот, выявлено статистически значимое снижение этого показателя в возрасте 1-го месяца

(рис.5). В другие же сроки наблюдения отклонений от контрольных цифр в содержании глюкозы в крови не отмечено.

При определении уровня С-пептида обнаружен значимо повышенный его уровень в возрасте 2-х недель на 25% по сравнению с контролем (рис.6). В дальнейшем содержание С-пептида падает и не имеет статистически значимых отличий от контроля.

Анализ исследования α -амилазы показал повышенную активность в возрасте 2-х недель на 24,01%. В возрасте 1-го месяца этот показатель снижается до контрольных цифр, однако при достижении половозрелости вновь повышается, превышая контрольные значения на 24,39%.

Таким образом, применение комплекса аминокислот - предшественников глутатиона на фоне алкоголизации вызывает некоторые позитивные изменения в морфофункциональных показателях поджелудочной железы. В данной группе отмечается улучшение морфометрических показателей по сравнению с группой животных, получавших один этанол. Это касается объема ацинусов, объема ядер экзо- и эндокриноцитов, диаметра островков. Однако наряду с положительными моментами имеют место участки деструкции ацинарной ткани железы с выраженной дисконкомплексацией ацинусов. На протяжении всех сроков наблюдения отмечается отек стромы. Биохимические исследования выявили повышенный уровень С-пептида, альфа-амилазы в различные возрастные периоды. Основываясь на полученных данных можно сказать, что аминокислоты - предшественники глутатиона - обладают определенным протективным действием, но недостаточным для полной коррекции нарушений, возникающих в результате пренатальной алкогольной интоксикации.

Более выраженный протективный эффект получен при применении комплекс витаминов – ретинола, токоферола, аскорбиновой кислоты. Имеются многочисленные сведения об антиокислительном действии данных витаминов (Бурлакова Е.Б. и соавт., 1998; Polideri M.C., 1998; Сидорова Ю.А. и соавт., 2003). Причем отмечается снижение их содержания в организме при хронической алкоголизации (Gvozdjakova A. Et al., 1999). Кроме того, они взаимодополняют друг друга, так как ретинол и токоферол осуществляют свои антирадикальные эффекты в липидной среде, а аскорбат – в водной. В последние годы изучался эффект синергизма при одновременном употреблении токоферола и аскорбиновой кислоты (Chan Alvin C., 1993; Bohm F., 1998), а также токоферола, ретинола и аскорбата (Ко-

новалова Г.Г. и соавт., 2003). Исходя из вышеизложенного нами была избрана данная комбинация витаминов-антиоксидантов.

У животных с дотацией витаминами получен самый низкий показатель летальности среди всех опытных групп (табл.2). Средняя масса тела и масса поджелудочной железы не имела статистически значимых отличий от подобных показателей у контрольных животных и имела максимальные значения среди остальных групп (рис.1).

Гистологическая картина в описываемой группе во все сроки наблюдения мало чем отличалась от таковой в контрольной группе. Размеры ацинусов, их ядер близки к контролю (рис.3). Морфометрические показатели эндокринной части железы также не имели значимых отличий от контрольных значений во всех возрастных группах животных (рис.4). Если в группе животных с коррекцией аминокислотами сохранялись изменения со стороны соединительной ткани, то в данной группе таких изменений не отмечено: показатель толщины междольковой соединительнотканной прослойки на уровне контрольного и сохранял тенденцию к уменьшению с возрастом животных (рис.2).

При определении уровня глюкозы в сыворотке крови выявлено значимое снижение этого показателя на 12,49% по сравнению с контролем, как и в группе с коррекцией аминокислотами. В остальные сроки наблюдения уровень глюкозы близок к контрольным значениям (рис.5). Не отмечено отклонений от контрольных значений в данной группе и при определении уровня С-пептида (рис.6).

Однако на ранних этапах постнатального онтогенеза, по-видимому, все еще сказывается токсическое влияние введенного в пренатальный период этанола, что проявилось в повышенной активности α -амилазы на 56,71% в сравнении с контролем в возрасте 2-х недель (рис.7). В дальнейшем активность α -амилазы снижается и не превышает контрольных значений. Следовательно, можно с уверенностью сказать, что одновременное употребление комплекса витаминов, уменьшает повреждающее действие алкоголя, но не снимает его полностью.

Анализ приведенных данных позволяет выделить комплекс витаминов как высоко эффективный антиоксидант для коррекции нарушений со стороны поджелудочной железы при пренатальном воздействии алкоголя. При применении указанных витаминов морфофункциональные показатели незначительно отличаются от таковых у контрольных животных. Не выявлено изменений в структурной организации органа.

Таким образом, на основании приведенных данных можно констатировать выраженное влияние внутриутробного контакта с этанолом на развитие поджелудочной железы. При этом следует отметить, что выявленные нарушения в морфофункциональных показателях сохраняются и в постнатальном онтогенезе в течение довольно длительного периода – до достижения крысами половозрелости. По-видимому, одно из центральных мест в механизмах поражения железы при антенатальной интоксикации этанолом занимает развитие окислительного стресса, приводящего к процессам, нарушающим нормальное развитие поджелудочной железы в пренатальном периоде. Доказательством этого является выраженный протективный эффект примененных нами антиоксидантов.

ВЫВОДЫ

1. Пренатальная алкогольная интоксикация вызывает комплекс изменений структурных, морфометрических и функциональных показателей развития поджелудочной железы в постнатальном периоде онтогенеза с нарушением характера их корреляций.

2. Алкогольная интоксикация в пренатальном периоде вызывает отставание в росте массы тела и массы поджелудочной железы в постнатальном периоде.

3. В экзокринной части поджелудочной железы на фоне нарушения кровообращения выявлено уменьшение объема ацинусов и объема ядер экзокриноцитов.

4. В эндокринной части поджелудочной железы пренатально алкоголизированного потомства установлено уменьшение диаметра эндокринных островков, уменьшение объема ядер А- и В-клеток, изменение соотношения островковых клеток.

5. Морфологические изменения в экзокринной и эндокринной частях поджелудочной железы у пренатально алкоголизированных животных сопровождаются признаками стойкой гипогликемии, увеличения секреции С-пептида в 2-х недельном возрасте и повышения активности α -амилазы во все сроки наблюдения.

6. Применение комплекса аминокислот-предшественников глутатиона – глутамата натрия, глицина, метионина и антиоксидантных витаминов - токоферола, ретинола, аскорбата способствует выраженной коррекции процессов становления функциональной морфологии поджелудочной железы, что подтверждает взгляд о ведущей роли окислительного стресса в развитии нарушений при пренатальной алкогольной интоксикации.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ

1. Морфо-биохимические корреляции у крыс при моделировании этаноловой интоксикации // Морфология.-2002.- №2-3-С.106-107 / Соавт. О.З. Мкртчян, Е.И. Антонова, С.Ж. Вальтер, В.Е. Высокогорский.
2. Морфо-биохимические корреляции у крыс, алкоголизованных в пренатальном онтогенезе // Сборник научных трудов, посвященный 150-летию со дня рождения выдающегося отечественного ученого, члена-корреспондента Российской Академии Наук, профессора А.С. Догеля – Томск, 2002 – С. 147-148 / Соавт. О.З. Мкртчян, С.Ж. Вальтер, В.Е. Высокогорский.
3. Нарушение активности ферментов метаболизма глутатиона в печени пренатально алкоголизованных крыс // Труды Всероссийской конференции «Проблемы медицинской энзимологии» «Современные технологии лабораторной диагностики нового столетия» - Москва, 2002 – С.56-57 / Соавт. В.Е. Высокогорский, Н.Л. Самусева, А.В.Индутный.
4. Интенсивность свободно-радикальных процессов и нарушение закономерностей органогенеза у пренатально алкоголизованного потомства // Сибирский вестник психиатрии и наркологии, 2003-№1(27) –С.69-71 / Соавт. В.Е. Высокогорский, Н.Л. Самусева, О.З. Мкртчян, С.Ж. Вальтер.
5. Роль антиоксидантов в процессах органогенеза у пренатально алкоголизованного потомства крыс // Мед.акад.журнал.-2003.-№3, прил.4.-С.15-16 / Соавт. В.Е. Высокогорский, О.З. Мкртчян, С.Ж. Вальтер, А.В. Свердлова.
6. Роль антиоксидантов в снижении фетотоксичности алкоголя // Материалы межрегиональной конференции биохимиков Урала, Западной Сибири и Поволжья «Биохимия: от исследования молекулярных механизмов – до внедрения в клиническую практику и производство» - Оренбург, 2003.-С.68-71 / Соавт. В.Е. Высокогорский, О.З. Мкртчян, Н.Л. Самусева, Г.А. Лопухов.
7. Структурно-функциональная характеристика некоторых органогенезов у крыс, алкоголизованных в пренатальный период на фоне применения протективных средств // Морфология.-2003.-№ 5.- С.63 /Соавт. О.З. Мкртчян, В.Е. Высокогорский., С.Ж. Вальтер, А.В. Свердлова.
8. Морфо-биохимические показатели действия этаноловой интоксикации на некоторые органые системы // Сборник научных трудов

«Полевые и экспериментальные биологические исследования» Вып.6.-СПб: Изд-во ЛиСС.-2003.-С.80-82 / Соавт. О.З. Мкртчян, В.Е. Высокогорский, Е.И. Антонова, С.Ж. Вальтер.

9. Показатели углеводного обмена у потомства пренатально алкоголизованных крыс // Сборник трудов V межрегиональной научно-практической конференции, посвященной 25-летней годовщине создания наркологической службы Омской области «Актуальные вопросы наркологии».-Омск, 2004.-С.49-51 / Соавт. О.З. Мкртчян, В.Е. Высокогорский.

10. Влияние антиоксидантов на морфо-функциональные показатели поджелудочной железы у пренатально алкоголизованных крыс // Омский научный вестник.- Омск,2004.-С.210-213 / Соавт. О.З. Мкртчян., В.Е. Высокогорский.

11. Морфо-биохимические показатели поджелудочной железы при антенатальном воздействии этанолом // Сборник научных трудов «Актуальные вопросы биологии, медицины и экологии».-Томск, 2004.-Т.3, №1.-С.106-107 / Соавт. О.З. Мкртчян, В.Е. Высокогорский.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АК - аминокислоты

Вит – витамины

ПОЛ – перекисное окисление липидов

РИА – радио-иммунологический анализ

СРО – свободно-радикальное окисление

Автор выражает искреннюю благодарность доктору медицинских наук, профессору Валерию Евгеньевичу Высокогорскому за помощь при выполнении работы

КУРЧ НАТАЛЬЯ МИХАЙЛОВНА
МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ
РАЗВИТИЯ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У КРЫС,
АЛКОГОЛИЗИРОВАННЫХ В ПРЕНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ

03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Томск – 2004

Лицензия ЛР № 020845

Подписано в печать 12.05.04
Формат 60x84/16
Бумага офсетная
П.л. – 1,0
Способ печати - оперативный
Тираж 100

Издательско-полиграфический центр ОмГМА
644099, г. Омск, ул. Ленина, 12, тел: 23-05-98