

І.В. Лещенко, В.Г. Шевчук, О.А. Савченко, Т.М. Фалалєєва, С.А. Суходоля, Т.В. Берегова

Екзокринна функція підшлункової залози у щурів за умов експериментального ожиріння

Вивчали вплив неонатального введення гіперосмолярного хлориду натрію і глутамату натрію на екзокринну функцію підшлункової залози у щурів. Встановлено, що за умов ожиріння спостерігався розвиток гострого панкреатиту. Так, площа поперечного перерізу ацинусів достовірно зменшилася на 12 %, площа поперечного перерізу ядер ациноцитів збільшилася на 10 %, відстань між часточками залози зросла на 48 %. Вміст амілази в сироватці крові збільшився на 43%, амілази панкреатичної – на 68 %, ліпази – на 24 %.

Ключові слова: ожиріння, гіперосмолярний хлорид натрію, глутамат натрію, підшлункова залоза, гострий панкреатит.

ВСТУП

Ожиріння без перебільшення можна назвати епідемією світового масштабу, оскільки кількість осіб як серед дорослого, так і серед дитячого населення, що мають надмірну масу тіла, постійно збільшується [8]. І якщо ця тенденція збережеться, то все населення економічно розвинутих країн до середини наступного сторіччя буде страждати на ожиріння [8]. Насамперед це зумовлено малорухливим способом життя і висококалорійним харчуванням, що призводить до дисбалансу між надходженням та використанням енергії [1]. За даними вчених з університету Північної Кароліни, кількість людей з надлишковою масою тіла перевищує кількість голодуючих. Це стосується як багатих країн, так і тих, що розвиваються. У Сполучених Штатах та інших країнах з 1980 по 2004 р. поширеність ожиріння зросла з 15 до 33 % серед дорослого населення, а надлишкової маси тіла у дітей, що часто в дорослому віці призводить до ожиріння, збільшилась з 6 до 19 % [14, 18]. В Україні 30–40 % населення має зайву масу тіла, серед дітей і підлітків ожиріння становить 11–15 % [2].

Ожиріння є причиною розвитку багатьох захворювань серцево-судинної системи (ар-

теріальна гіпертонія, атеросклероз, ішемічна хвороба серця), інсульту, інсуліннезалежного цукрового діабету, передчасної смерті, захворювання опорно-рухового апарату (остеохондроз хребта та обмінно-дистрофічний поліартрит), хвороби гепатобіліарної системи (дискінезія жовчного міхура, хронічний холецистит, жовчнокам'яна хвороба), пухлини низки локалізацій, зокрема рак легень, молочної залози, тіла матки і яєчника, порушення оваріально-менструального циклу, дисліпідемія у жінок [1, 19]. Ожиріння зменшує тривалість життя на 3–5, а інколи на 15 років. Від захворювань, які пов'язані з ожирінням, в світі щорічно помирає 2,5 млн. людей. При схудненні на 10 % ризик розвитку серцево-судинної патології знижується на 9 %, цукрового діабету – на 44%, смертність від онкологічних захворювань, асоційованих з ожирінням – на 40 %, загальна смертність – на 20 % [1].

Ожиріння і метаболічні порушення, які виникають, є одним з етіологічних факторів хвороб підшлункової залози. За останні 30 років відзначено більш ніж двократне зростання частоти панкреатитів. Якщо на початку XX сторіччя захворюваність на гострий панкреатит була низькою, то вже на

межі XX–XXI століть за кількістю випадків це захворювання наздогнало гострий апендицит. Незважаючи на досягнуті успіхи в діагностиці та лікуванні панкреатитів, останніми роками відзначено зростання кількості людей із цією патологією, збільшення частоти рецидивів, тривалості загострень, активності клінічних проявів. Значна частина лікарів пов'язує це з порушенням характеру харчування та ожирінням. Механізми взаємозв'язку ожиріння і захворювань підшлункової залози залишаються до кінця незрозумілими і вимагають детального вивчення. У зв'язку з цим метою роботи було дослідити морфофункціональний стан підшлункової залози щурів за умов експериментального ожиріння.

МЕТОДИКА

Дослідження проведені на 40 щурах-самцях з дотриманням нормативів Конвенції з біоетики Ради Європи 1997 р., Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей, загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 р.), інших міжнародних угод та національного законодавства в цій галузі. Тварин утримували в умовах акредитованого віварію згідно зі «Стандартними правилами по упорядкуванню, устаткуванню та утриманню експериментальних біологічних клінік (віваріїв)». Прилади, що використовувалися для наукових досліджень, підлягали метрологічному контролю.

За добу до експерименту тварин піддавали харчовій депривації з вільним доступом до води. Щури були розділені на 4 групи. До I контрольної групи ввійшли інтактні 4-місячні щури. Новонародженим щурам дослідних груп на 2, 4, 6, 8, 10-ту добу життя підшкірно вводили фізіологічний розчин (8 мкл/г, II група), гіперосмолярний розчин хлориду натрію (8 мкл/г, III група) і глутамат натрію (4 мг/г, IV група) [12]. Через 4 міс у щурів всіх груп

було проаналізовано зміни маси тіла. Після чого тварин декапітували за допомогою летальної дози уретану (3 г/кг, внутрішньоочеревинно), видаляли та зважували вісцеральний жир. Підшлункову залозу видаляли та фіксували у 10%-му нейтральному формаліні впродовж 1–2 діб. Далі препарат піддавали зневодненню у розчинах етилового спирту в зростаючих концентраціях (70, 80, 90, 96 % – по одній добі у кожному розчині), просвітленню у діоксані (0,5–2 год) та хлороформі (1 год), просочуванню сумішшю парафіну з хлороформом 1:1 (до 2 год при +37 °C) та чистим парафіном (2 год при +56 °C), після чого заливали у чистий розплавлений парафін. Парафінові зрізи підшлункової залози завтовшки до 5 мкм виготовляли на санному мікротомі, фарбували гематоксиліном з дофарбуванням еозином [7].

Гістологічні препарати аналізували при збільшенні мікроскопа у 200 і 1500 разів. Кольорові мікрофотографії отримували за допомогою цифрової фотокамери Olympus C-5050 Zoom та мікроскопа Olympus BX-41 («Olympus Europe GmbH», Японія).

На знімках, отриманих зі збільшенням у 1500 разів, вимірювали площу поперечного перерізу ядер ендокринних і екзокринних клітин підшлункової залози, площу поперечного перерізу екзокринних клітин і відстань між часточками залози за допомогою програмного забезпечення UTHSCSA ImageTool, яке було розроблено у Техаському державному університеті (Сан-Антоніо, 1995–2002 р.). У сироватці крові визначали вміст амілази, панкреатичної амілази та ліпази стандартними біохімічними методами [9].

Наші результати згідно з тестом Шапіро–Вілкса були розподілені нормально і представлені у вигляді $M \pm m$. Статистичне порівняння між групами проводили з використанням критерію t Стюдента для незв'язаних вибірок. Статистична значимість була встановлена на рівні $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У інтактних щурів І і тварин ІІ групи (фізіологічний розчин) підшлункова залоза мала типову будову. Ацинуси її екзокринної частини були нормальної будови, ациноцити мали конічну форму та виражену полярність – апікальну (зимогенну) та базальну (гомогенну) зони. У базальній частині ациноцитів розміщені ядра з чітко окресленими ядер-

цями (рис. 1). Площа поперечного перерізу ацинусів становила $1273,0 \pm 62,7$ мкм², ядер ациноцитів – $19,8 \pm 0,3$ мкм², а відстань між часточками підшлункової залози у щурів контрольної групи – $2,7 \pm 0,1$ мкм (рис. 2).

Вміст ферментів (амілаза, панкреатична амілаза, ліпаза), що характеризують стан підшлункової залози, був в межах норми (таблиця). Значущих змін маси тіла та вісцерального жиру не спостерігалось.

Вміст ферментів (ум.од./л) у сироватці крові щурів з експериментальним ожирінням ($M \pm m$)

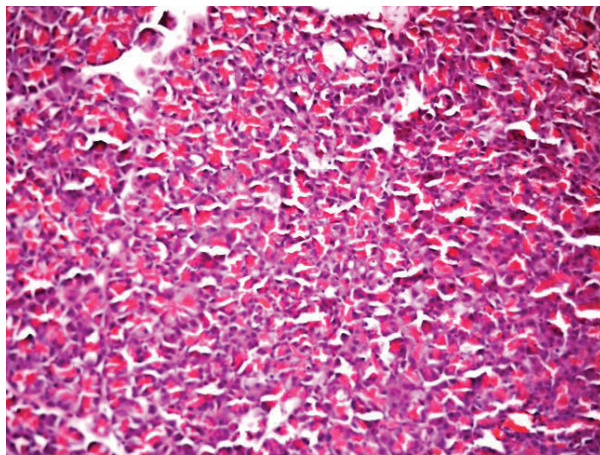
Групи тварин	Амілаза	Панкреатична амілаза	Ліпаза
Інтактний контроль	$61 \pm 4,80$	$22 \pm 1,51$	$17 \pm 1,53$
Фізіологічний розчин	$60 \pm 4,80$	$23 \pm 1,45$	$17 \pm 1,91$
Гіперосмолярний розчин хлориду натрію	$86 \pm 6,88^*$	$37 \pm 1,29^*$	$21 \pm 1,91^*$
Глутамат натрію	$115 \pm 9,20^{*,**}$	$59 \pm 6,67^{*,**}$	$70 \pm 5,60^{*,**}$

* $P < 0,05$ щодо контролю, ** $P < 0,05$ щодо гіперосмолярного розчину хлориду натрію.

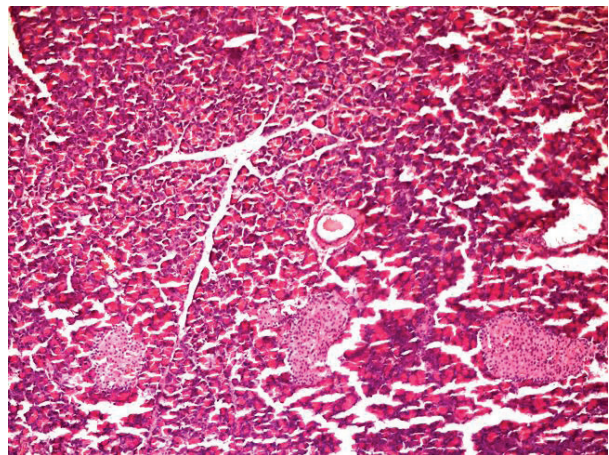
У щурів, що отримували гіперосмолярний розчин хлориду натрію (ІІІ група), маса тіла та вісцерального жиру перевищувала контрольні показники на 85 і 151 % ($P < 0,01$) відповідно (рис. 3).

У підшлунковій залозі спостерігався виражений міжчасточковий набряк (рис. 4,а), міжчасточковий і периваскулярний ліпоматоз. Виявлені ділянки з лімфоїдно-клітинною ін-

фільтрацією та з вогнищевим некрозом паренхіми (див. рис. 4,б). Площа поперечного перерізу ацинусів була знижена на 12 % ($P < 0,05$), а ядер ациноцитів збільшена на 10 % ($P < 0,05$), відстань між часточками залози – на 48 % ($P < 0,05$) щодо контролю (див. рис. 2). Вміст ферментів у сироватці крові був збільшений: амілази на 43 %, амілази панкреатичної – 68 % і ліпази – на 24 % ($P < 0,05$; див. таблицю).



а



б

Рис. 1. Мікрофотографії підшлункової залози щурів – нормальна гістологічна будова екзокринної паренхіми: а – інтактний контроль, б – фізіологічний розчин. Забарвлення гематоксиліном-еозинном. 3б. х200

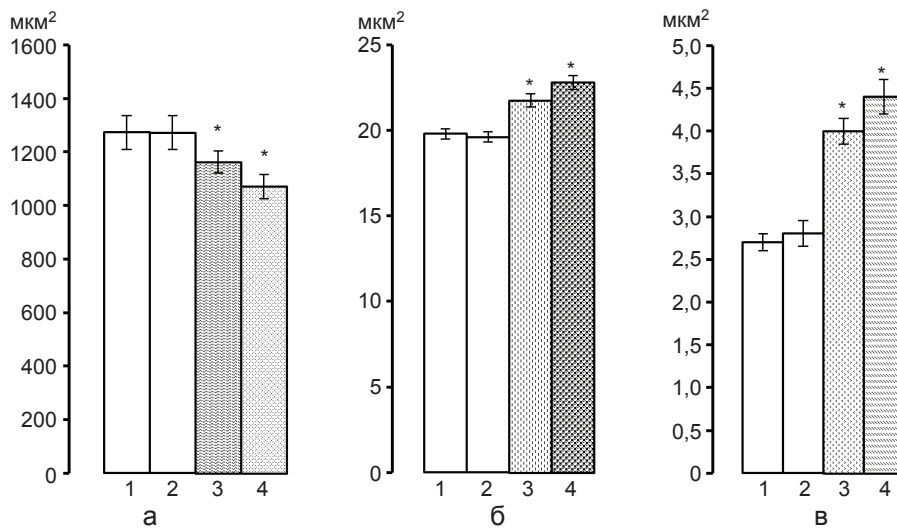


Рис. 2. Морфометричні показники підшлункової залози (а – площа поперечного перерізу ацинусів, б – площа поперечного перерізу ядер ациноцитів, в – міжчасточкова відстань): 1 – інтактний контроль; 2 – фізіологічний розчин; 3 – гіперосмолярний розчин хлориду натрію; 4 – глутамат натрію. * $P < 0,05$ щодо контролю

Отже, у щурів, що отримували гіперосмолярний розчин хлориду натрію в неонатальному періоді, екзокринна (зовнішньосекреторна, або екскреторна) функція підшлункової залози була порушена, що проявлялося у збільшенні концентрації ферментів (амілази та ліпази) в крові, яке спостерігається при гострому панкреатиті [6]. Таким чином, розвивалось ожиріння у дорослому віці, маса тіла щурів та маса вісцерального жиру перевищувала контрольні значення в 1,9 та 2,4

раза відповідно. Ін'єкції з гіперосмолярним розчином новонародженим щурам порушували систему регуляції водно-сольового балансу. Показано, що підвищене вживання харчової солі призводить до зростання концентрації натрію в плазмі крові, внаслідок чого стимулюється спрага, збільшуючи тим самим споживання рідини. Це призводить до збільшення об'єму циркулюючої крові [3, 5, 11]. Дійсно, щури, яким вводили гіперосмолярний розчин хлориду натрію, споживали

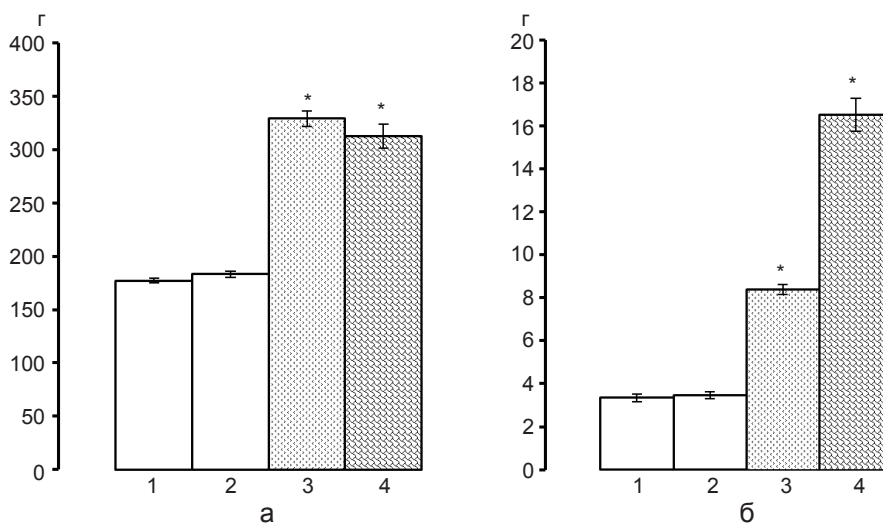


Рис. 3. Зміни маси тіла (а) та вісцерального жиру (б) у щурів за умов експериментального ожиріння: 1 – інтактний контроль; 2 – фізіологічний розчин; 3 – гіперосмолярний розчин хлориду натрію; 4 – глутамат натрію. * $P < 0,01$ щодо контролю

воду значно більше, ніж у інших досліджуваних групах.

За даними літератури, іони натрію подразнюють супраоптичні ядра переднього відділу гіпоталамуса, що призводить до підвищеного синтезу вазопресину, котрий по аксонам їхніх нейронів транспортується через задній відділ гіпоталамуса у задні частки гіпофіза, а з нього в кров'яне русло. Кровотоком А вазопресин (аргініновий) заноситься в збіральні трубочки нирок і за допомогою V_2 -рецепторів відкриває в їх стінці аквапорини, через які вода переходить у міжклітинний простір й далі в кров. Це призводить до накопичення її в організмі, розвитку набряків і зростання маси тіла щурів [4].

Коли підвищена концентрація виділеного вазопресину потрапляє в латеральні ядра гіпоталамуса (центр голоду) внаслідок їх стимуляції розвивається прожерливість (гіперфагія), якщо у вентромедіальні ядра (центр насичення) і пригнічує їх – до безперервного живання їжі та ожиріння.

Надмірне вживання харчової солі призводить до накопичення Na^+ в організмі, які викликають деполяризацію зовнішньосекреторних клітин підшлункової залози [5], в результаті чого їх синтетична функція зростає (про це свідчить збільшення концентрації її

ферментів – амілази і ліпази крові). В процесі наростаючого ожиріння, завдяки зворотному негативному зв'язку, накопичуваний жир самостійно стимулює синтез цих ферментів.

L-вазопресин (лізиновий) через V_1 -рецептори деполяризує гладенькі м'язи судин. Вони, скорочуючись, викликають тривале звуження судинного русла, що призводить до погіршення кровопостачання підшлункової залози та її секреторних клітин. Тривале звуження судин, дефіцит кисню і поживних речовин у тканинах викликають значні метаболічні та структурні зміни в залозі, які за допомогою зворотного зв'язку спричиняють посилене утворення клітинами залози місцевих судинорозширювальних речовин. Висловлюється думка, що місцеві вазодилататори дифундують до прекапілярних сфінктерів, метаартеріол і артеріол і викликають їх значне тривале розширення (що спостерігалось у наших дослідженнях). До таких судинорозширювальних речовин відносяться: гістамін, аденозин, вуглекислий газ, іони калію і водню. Тобто розвиток значних структурних змін тканин підшлункової залози проявляється її дисфункцією, подібною до клінічних форм гострого панкреатиту.

У щурів, що отримували глутамат натрію (IV група), маса тіла та вісцерального жиру

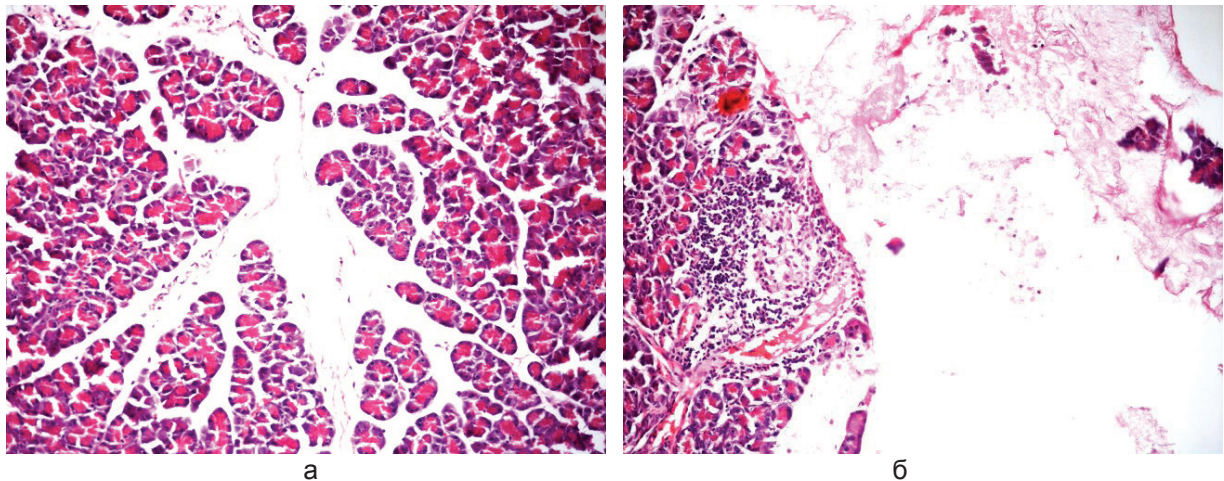


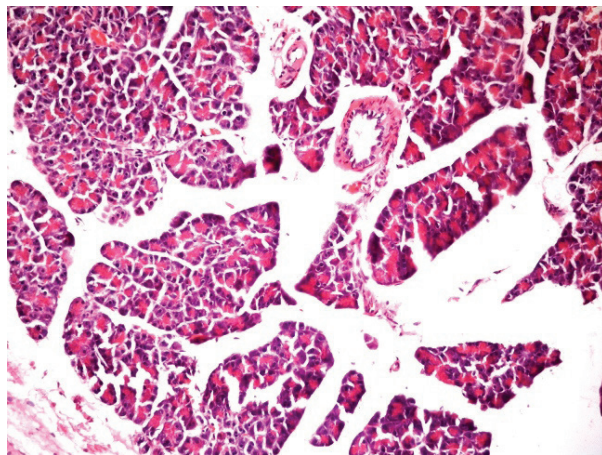
Рис. 4. Мікрофотографії підшлункової залози III групи щурів – міжчасточковий набряк (а), ділянка некрозу паренхіми, лімфоїдно-клітинна інфільтрація (б). Забарвлення гематоксиліном-еозином. 3б. х200

перевищувала контрольні значення на 76 і 395 % ($P < 0,001$) відповідно. Статистичної різниці між значеннями маси тіла в III та IV групах не було, проте маса вісцерального жиру, в групі щурів, що отримували в неонатальному періоді глутамат натрію, була в 2 рази більше, ніж у тварин, які отримували хлорид натрію та в 5 разів порівняно з контролем (див. рис. 3). У підшлунковій залозі цієї групи спостерігався виражений міжчасточковий набряк (рис. 5,а), міжчасточковий та периваскулярний ліпоматоз (див. рис. 5,б). Судини були різко розширені, спостерігалось повнокров'я, утворювались екстравазати. Площа поперечного перерізу ацинусів у порівнянні з інтактним контролем була зменшена на 16 % ($P < 0,05$). Площа поперечного перерізу ядер ациноцитів була збільшена на 15 %, відстань між часточками підшлункової залози – на 63 % ($P < 0,05$) щодо контролю. Статистичної різниці у морфометричних показниках між III і IV групами щурів не було.

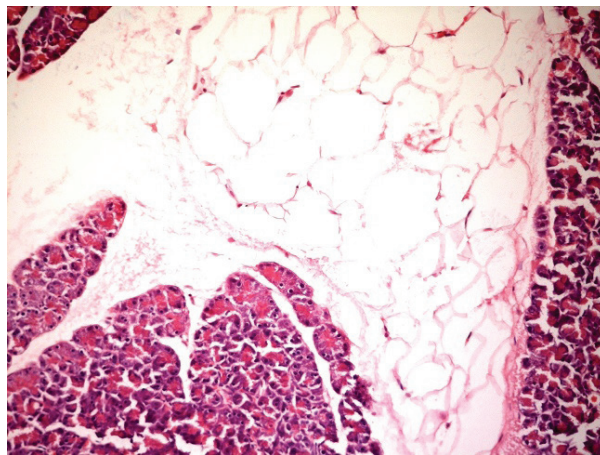
Концентрація ферментів у сироватці крові в IV групі щурів була збільшена у порівнянні з контрольною групою, а саме амілази – на 92 % ($P < 0,001$), амілази панкреатичної – на 168 % ($P < 0,001$) та ліпази – на 312 % ($P < 0,001$), що в 1,3, 1,6 та в 3,3 рази відповідно більше, ніж в III групі (див. таблицю).

Отримані результати підтверджують дані інших дослідників, які встановили, що введення новонародженим гризунам глутамату натрію індукує розвиток вісцерального ожиріння у дорослих тварин та є моделлю ожиріння [15], а також викликає ураження в дугоподібному та вентромедіальному ядрах гіпоталамуса, які стають менш чутливими до лептину та інсуліну (гормонів насичення), в результаті чого розвивається гіперлептинемія та гіперінсулінемія [13]. Водночас він суттєво стимулює секрецію шлунковими залозами греліну, який накопичується в гіпоталамусі та стимулює центри голоду, що призводить до посилення апетиту.

Зміни структури і функції підшлункової залози розвиваються при глутамат-натрієвому ожирінні і є більш вираженими, ніж при введенні гіперосмолярного розчину хлориду натрію. Натрієва сіль глутамінової кислоти є класичним орексигеном (збільшує вживання їжі та її засвоєння). Механізм її дії пов'язаний насамперед з дугоподібними ядрами гіпоталамуса, нейрони яких синтезують орексигенні речовини – нейропептид Y (NPY – нейрони) і меланінопосередковий білок (AGRP – нейрони). Підвищення їх концентрації в організмі різко посилює засвоєння їжі, знижує витрати енергії, призводить до вираженого ожиріння.



а



б

Рис. 5. Мікрофотографії підшлункової залози IV групи щурів – міжчасточковий набряк (а), виражений міжчасточковий ліпоматоз (б). Забарвлення гематоксиліном-еозином. Зб. х200

Важливу роль у механізмах ожиріння відіграє гастроінтестинальний гормон грелін, який виділяється парієтальними клітинами шлунка, слизовою оболонкою ясен і парадонта та в значно меншій кількості кишками. Вміст греліну в крові підвищується натщесерце перед і в перші хвилини після вживання їжі. Це дало можливість трактувати його як гормон апетиту, стимулятор вживання і засвоєння їжі [13].

Таким чином, неонатальне введення гіперосмолярного розчину хлориду натрію і глутамату натрію призводило до ожиріння в дорослому віці та розвитку гострого панкреатиту, що підтверджувалося зміною морфометричних показників підшлункової залози та зростанням концентрації її ферментів у сироватці крові.

І.В. Лещенко, В.Г. Шевчук, А.А. Савченко, Т.М. Фалалеева, С.А. Суходоля, Т.В. Береговая

ЭКЗОКРИННАЯ ФУНКЦИЯ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОЖИРЕНИИ

Изучали влияние неонатального введения гиперосмолярного хлорида натрия и глутамата натрия на экзокринную функцию поджелудочной железы у крыс. Установлено, что при ожирении наблюдалось развитие острого панкреатита. Так, площадь поперечного сечения ацинусов уменьшилась на 12 %, площадь поперечного сечения ядер ациноцитов увеличилась на 10 %, расстояние между дольками железы выросла на 48 %. Содержание амилазы увеличилось на 43 %, амилазы панкреатической – на 68 %, липазы – на 24 %. Ключевые слова: ожирение, гиперосмолярный хлорид натрия, глутамат натрия, поджелудочная железа, острый панкреатит.

I.V. Leschenko, V.G. Shevchuk, O.A. Savchenyuk, T.M. Falalyeyeva, S.A. Suhodolya, T.V. Beregova

EXOCRINE FUNCTION OF PANCREAS IN RATS UNDER EXPERIMENTAL OBESITY

The influence of neonatal administration of hyperosmolar sodium chloride and sodium glutamate on the exocrine function of the pancreas in rats has been investigated. It was observed the development of acute pancreatitis under experimental obesity. The cross-section area of acini reduced by 12 %, the cross-section area of acinocytes nuclei increased by 10 %, the length between the lobes of the gland

has grown by 48 %. The level of amylase was increased by 43 %, the levels of pancreatic amylase and lipase were increased by 68 % and 24 %, respectively.

Key words: obesity, hyperosmolar sodium chloride, monosodium glutamate, pancreas, acute pancreatitis.

O.O. Bogomoletz National Medical University, Kyiv, Ukraine;

Taras Shevchenko National University, Kyiv;

M.I. Pirogov National Medical University, Vinnitsa.

REFERENCES

1. Ginsburg MM. Obesity and metabolic syndrome. Impact on health, prevention and treatment. Samara: Parus; 2000.
2. Girina OM, Gromovich AV. [The prevalence of obesity as a risk factor for somatic pathology among adolescents]. Practitioner. 2012;2:32-35. Russian.
3. He FJ, Marrero NM, MacGregor GA. Salt intake is related to soft drink consumption in children and adolescents: a link to obesity? Hypertension. 2008 Mar;51(3):629-34.
4. Karppanen H, Mervaala E. Sodium intake and hypertension. Prog Cardiovasc Dis. 2006 Sep-Oct;49(2):59-75.
5. Kuo JJ, Silva AA, Hall JE. Hypothalamic melanocortin receptors and chronic regulation of arterial pressure and renal function. Hypertension. 2003 Mar;41(3 Pt 2):768-74.
6. Leshchenko IV, Shevchuk VH, Falalieieva TM, Beregova TV. [The influence of long-term monosodium glutamate feeding on the structure of rats pancreas]. Fiziol Zh.58(2):59-65. Ukr.
7. Lilly R. Histopathological technique and practical histochemistry. K.: Mir; 1969.
8. Livingstone B. Epidemiology of childhood obesity in Europe. Eur J Pediatr. 2000 Sep;159 Suppl 1:S14-34.
9. Lowe ME. Assays for pancreatic triglyceride lipase and colipase. Methods Mol Biol. 1999;109:59-70.
10. Martinez J, Sanchez-Paya J, Palazon JM, Suazo-Barahona J, Robles-Diaz G, Perez-Mateo M. Is obesity a risk factor in acute pancreatitis? A meta-analysis. Pancreatolgy. 2004;4(1):42-8.
11. McKinley MJ, Johnson AK. The physiological regulation of thirst and fluid intake. News Physiol Sci. 2004 Feb;19:1-6.
12. Miskowiak B, Partyka M. Effects of neonatal treatment with MSG (monosodium glutamate) on hypothalamopituitary-thyroid axis in adult male rats. Histol Histopathol. 1993 Oct;8(4):731-4.
13. Nakagawa T, Ukai K, Ohya T, Gomita Y, Okamura H. Effects of chronic administration of sibutramine on body weight, food intake and motor activity in neonatally monosodium glutamate-treated obese female rats: relationship of antiobesity effect with monoamines. Exp Anim. 2000 Oct;49(4):239-49.
14. Ogden CL, Carroll MD, Flegal KM. Epidemiologic trends in overweight and obesity. Endocrinol Metab Clin North Am. 2003 Dec;32(4):741-60, vii.
15. Oida K, Nakai T, Hayashi T, Miyabo S, Takeda R. Plasma lipoproteins of monosodium glutamate-induced obese rats.

- Int J Obes. 1984;8(5):385-91.
16. Porter KA, Banks PA. Obesity as a predictor of severity in acute pancreatitis. Int J Pancreatol. 1991 Nov-Dec;10(3-4):247-52.
17. Segersvard R, Sylvan M, Herrington M, Larsson J, Permert J. Obesity increases the severity of acute experimental pancreatitis in the rat. Scand J Gastroenterol. 2001 Jun;36(6):658-63.
18. Serdula MK, Ivery D, Coates RJ, Freedman DS, Williamson DF, Byers T. Do obese children become obese adults? A review of the literature. Prev Med. 1993 Mar;22(2):167-77.
19. Yang W., Kelly T., He J. Genetic Epidemiology of Obesity. Epidemiol Rev. 2007(29): 49-61.

*Нац. мед. ун-т ім. О.О. Богомольця, Київ;
Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка;
Вінницьк. нац. мед. ун-т ім. М.І. Пирогова
E-mail: falalyeyeva@mail.ru*

*Матеріал надійшов до
редакції 24.10.2013*