

А. А. Кикимбаева, А. П. Андреева, А. Б. Аубакиров, А. Н. Бажанов, А. С. Лебедев

## ГИСТОФЛЮОРИМЕТРИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ ИНСУЛИНА В ЭНДОКРИННОЙ ТКАНИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРЫС В ПОСТРЕАНИМАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ<sup>1</sup>

ЦНИЛ (зав. А. С. Лебедев) и кафедра гистологии (зав. — проф. А. Н. Бажанов) Акмолинского медицинского института Минздрава Республики Казахстан

По справедливому утверждению В. А. Неговского [10], среди систем организма, принимающих непосредственное участие как в процессе умирания, так и в постреанимационном периоде (ПРП), изменения в нейроэндокринной регуляции приобретают ведущее значение. Во время остановки кровообращения нейроэндокринная регуляторная система испытывает острое кислородное голодание, неизбежно приводящее к глубоким метаболическим, функциональным и структурным нарушениям в деятельности инкреторного аппарата организма. В исследованиях А. В. Волкова [3] выявлена специфика нарушений эндокринного статуса оживленных животных и показано его решающее влияние на исход реанимации. Изучение динамики гормонов в ПРП показало, что, начиная с первых минут после оживления, формируется новый и во многом извращенный гормональный баланс организма [6]. В частности, в крови оживленных крыс резко возрастал уровень глюкогона и инсулина (Ин), определенных радиоиммунологическими методами [6]. Более детальное изучение гормонов поджелудочной железы (ПЖ), осуществленное Е. Н. Сочневой, выявило сложную картину расстройств гомеостаза глюкозы и гормонального равновесия этой железы в ПРП. Уже через 3 ч после реанимации отмечалось достоверное повышение уровня глюкозы в 1,5 раза, глюкагона в 4,3 раза, а Ин в 1,2 раза. Но и в более поздние сроки опыта тенденция к росту указанных параметров углеводного обмена сохранялась [13]. Сложившаяся в экспериментах Е. Н. Сочневой парадоксальная ситуация с одновременным длительным повышением уровня трех основных регуляторов углеводного гомеостаза не укладывается ни в одну из четырех стандартных картин диабета, описанных И. Г. Акмаевым [1], что в свою очередь подтверждает развиваемую им особую форму гипоталамической и бульбарной регуляции деятельности островковых клеток ПЖ [2].

Это обстоятельство и побудило нас обратиться к морфологическому анализу состояния эндокринного аппарата ПЖ крыс в различные сроки ПРП с количественным определением содержания Ин в островковых В-клетках в гистологических срезах железы. До настоящего времени оценка функционального состояния В-клеток по со-

держанию Ин в различных условиях эксперимента проводилась лишь в культурах эндокринной ткани ПЖ [7—9, 14].

### Материалы и методы

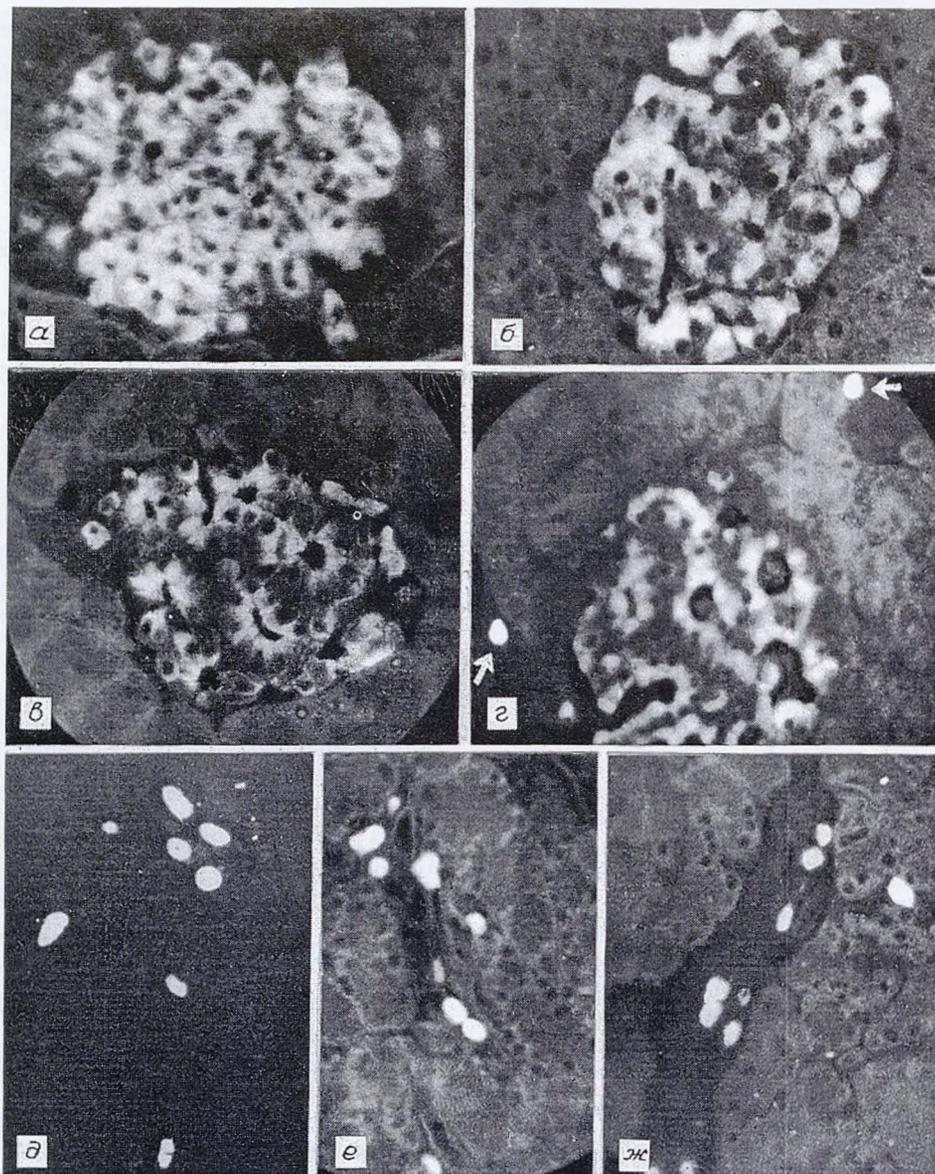
Опыты проведены на 42 белых беспородных крысах массой 160—230 г. 10-минутную клиническую смерть моделировали по методу В. Г. Корпачева путем пережатия сосудистого пучка у основания сердца [5]. Реанимационные мероприятия включали непрямой массаж сердца и искусственную вентиляцию легких [5, 6]. ПЖ извлекали через 3, 9 ч, 3, 5, 7, 14 и 30 сут после оживления. 7 интактных крыс служили контролем. Материал фиксировали в жидкости Бузна, заливали в парафин. Для выявления депонированного в клетках панкреатических островков Ин использовали псевдоизоцианиновую окраску срезов [16]. Она основана на взаимодействии в В-клетках диэтилпсевдоизоцианинхлорида с А-цепью молекулы Ин и проявляется яркой флюоресценцией островковых В-клеток [17]. Для количественной оценки Ин в островковых клетках РЖ в разные сроки после реанимации животных использовали микрофлюориметрическую приставку, апробированную Г. Г. Мейрамовым [7—9]. Все цифровые данные обработаны статистически. Микрофотосъемку осуществляли на фотопленке "Свема" А-2 чувствительностью в 400 ед.

### Результаты и их обсуждение

При изучении окрашенных псевдоизоцианином препаратов ПЖ и у подопытных, и у интактных животных в поле зрения отчетливо выявлялись флюоресцирующие ярко-красным светом островки (Ост) Лангерганса. Наиболее интенсивно светилась центральная зона островковых клеток, представленная инсулинпродуцирующими В-клетками. Ближе к периферии Ост флюоресценция В-клеток уменьшалась, но нередко и за пределами Ост выявлялись одиночные ярко флюоресцирующие В-клетки. При использовании визуального метода оценки интенсивности флюоресценции обнаружены различия в степени свечения Ост подопытных животных (см. рисунок, б—г) по сравнению с контрольными (см. рисунок, а). Но оценка интенсивности флюоресценции инсулинсодержащих клеток у экспериментальных животных в разные сроки ПРП не может быть выявлена визуально. Флюориметрия здесь оказалась не только необходимым, но и единственным объективным методом определения в относительных единицах содержания Ин в панкреатических Ост [7], который позволил во всех исследованных случаях установить достоверные различия между опытными и контрольными данными. Результаты исследования отражены в таблице.

Гистофлюориметрический метод оценки содержания Ин в В-клетках Ост позволяет проводить одновременный сочетанный анализ структуры и функции инсулинпродуцирующих клеток на различных этапах постреанимационного состояния животного. Так, уже через 3 ч после оживления

<sup>1</sup> Авторы выражают глубокую признательность д-ру мед. наук Г. Г. Мейрамову (Карагандинский медицинский институт) за предоставление диэтилпсевдоизоцианина (фирма "Seriva", ФРГ) для окраски срезов и их гистофлюориметрический анализ, благодарят д-ра мед. наук В. И. Корчина за интерес к работе и канд. мед. наук Б. И. Медведева за помощь в микрофотографии.



Инсулинпродуцирующие В-клетки в панкреатических Ост (*a—z*), ацинусах (*d*) и протоковом эпителии (*e, ж*) крыс в ПРП.

Ок.  $\times 7$ , об.  $\times 40$ . Фиксация в жидкости Буэна. Окраска псевдолюзоцианином. *a* — контроль; *b* — через 3 ч после оживления; *c* — через 9 ч; *z* — на 3-и сутки после реанимации; *d* — инсулинпродуцирующие В-клетки в ацинусах ПЖ; *e, ж* — те же клетки в протоковом эпителии ПЖ.

уровень Ин в В-клетках достоверно снижается в 1,3 раза, что находит свое отражение в структуре этих клеток. Как видно на рисунке, *b*, инсулинпродуцирующие клетки приобретают гетероморфность, межклеточные щели освобождаются от гормона, наблюдаются отдельные В-клетки с апикальной локализацией Ин вместо свойственной норме диффузной [10, 15]. Эти изменения в морфологии В-клеток еще более отчетливо проявляются через 9 ч после реанимации (см. рисунок, *в*). Здесь присущий норме [15] "непрямой" путь транспорта Ин (В-клетка  $\rightarrow$  межклеточная щель  $\rightarrow$  перикапиллярное пространство  $\rightarrow$  капилляр) заменяется на "прямой" (В-клетка  $\rightarrow$  перикапиллярное пространство  $\rightarrow$  капилляр). Локализация Ин в В-клетках повсеместно становится апикальной. В-клетки гроздьями группируются вокруг стазированных капилляров и Ост приобретает

специфические черты строения, резко отличающиеся от нормы (см. рисунок, *a*). На наш взгляд, подобная особая структура Ост способствует ускоренному выведению гормона на потребности организма, находящегося в экстремальном состоянии. По этой причине она длительное время прослеживается в Ост ПЖ реанимированных животных (см. рисунок, *z*). Результаты гистофлюориметрии (см. таблицу) подтверждают усиленный выброс Ин в кровь. По уровню содержания Ин В-клетками Ост подопытных крыс лишь на 30-е сутки после оживления приближаются к таковым в контроле. Наряду с этим на 3-и сутки после эксперимента в ПЖ развиваются процессы компенсаторного характера. Они проявляются в трансформации "смешанных" ациноинсулярных клеток (см. рисунок, *z*; стрелки), ацинарно-железистых (см. рисунок, *d*), и, наконец, клеток про-

Результаты гистофлюориметрии Ин в ПЖ крыс в постреанимационном периоде после 10-минутной клинической смерти

Статистический показатель	Интактные крысы	Время после выживания						
		ч		сут				
		3	9	3	5	7	14	30
$M \pm m$	$2,16 \pm 0,03$	$1,61 \pm 0,07$	$1,77 \pm 0,06$	$1,58 \pm 0,03$	$1,67 \pm 0,04$	$1,91 \pm 0,03$	$1,70 \pm 0,02$	$2,11 \pm 0,04$
	—	6,79	5,33	12,01	8,72	4,74	10,22	0,73
$p$	—	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,5

токового эпителия (см. рисунок, *e, ж*) в инсулярные. Возможность подобной трансформации показана в ряде исследований в различных экспериментальных условиях [11, 15] и у больных с инсулинзависимым сахарным диабетом [12]. Она прослеживается в филогенетическом и онтогенетическом становлении эндокринного аппарата ПЖ [11]. Наши наблюдения с использованием высокочувствительной гистофлюориметрической методики выявления В-клеток в Ост, ацинусах и дуктальном эпителии ПЖ делают эту трансформацию несомненной. Увеличением резервного пула В-клеток и ускоренной секрецией из них Ин, вероятно, и объясняется стойкое повышение уровня этого гормона в крови крыс, перенесших терминальное состояние [3—6, 13]. В наших опытах в ответную реакцию организма вовлекается не только эндокринная ткань ПЖ, что наблюдается при обычных формах экспериментального диабета [1, 2, 9], но и паравентрикулярные ядра гипоталамуса совместно с задней долей гипофиза [2, 4]. При этом повышенная продукция вазопрессина и окситоцина многократно увеличивает выброс глюкагона [2, 4] и обеспечивает высокую гипергликемию [13]. Можно полагать, что одновременное парадоксальное увеличение трех основных регуляторов углеводного обмена [6, 13] объясняется спецификой нейроэндокринных нарушений гомеостаза в реанимированном организме [3, 6, 10, 13].

### Выводы

1. Терминальное воздействие и факторы постреанимационного состояния оказывают существенное влияние на эндокринный аппарат ПЖ, вызывая в В-клетках Ост не только усиленный выброс Ин, но и способ их взаимосвязи с капиллярным руслом.

2. Непрямой путь вывода Ин, свойственный норме, заменяется прямым выводом гормона в кровь реанимированных животных.

3. Те же факторы реанимации приводят к трансформации смешанных (ациноинсулярных), ацинарно-железистых клеток и клеток протокового эпителия железы в инсулинпродуцирующие В-клетки.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Акмаев И. Г. // Пробл. эндокринологии. — 1990. — № 4. — С. 12—18.
2. Акмаев И. Г. // Морфология. — 1992. — № 3. — С. 5—39.
3. Волков А. В. // Пат. физиол. — 1987. — № 3. — С. 27—29.
4. Колесник Ю. М., Орестенко Ю. Н., Абрамов А. В. // Пробл. эндокринологии. — 1993. — № 1. — С. 45—48.
5. Корпачев В. Г., Лысенков С. П., Тель Л. З. // Пат. физиол. — 1982. — № 3. — С. 78.
6. Лебедев А. С., Зуева О. М., Корпачев В. Г. // Экстремальные и терминальные состояния в эксперименте и клинике. — Новосибирск, 1988. — С. 9—12.
7. Мейрамов Г. Г., Тусунбекова Г. Т., Мейрамова Р. Г. // Пробл. эндокринологии. — 1987. — № 6. — С. 49—51.
8. Мейрамов Г. Г., Конерт К. Д., Турчин И. С. и др. // Там же. — 1990. — № 1. — С. 66—69.
9. Мейрамов Г. Г. Состояние В-клеток панкреатических островков в условиях действия некоторых лекарственных и химических соединений: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — М., 1993.
10. Неговский В. А. Очерки по реаниматологии. — М., 1986. — С. 196—205.
11. Пузырев А. А., Иванова В. Ф. // Морфология. — 1992. — № 1. — С. 5—28.
12. Северюгина Э. С., Дюшева Т. Г., Разгулина Л. Е. и др. // Арх. пат. — 1992. — № 12. — С. 18—23.
13. Сочнева Е. Н. Нарушения гомеостаза глюкозы в постреанимационном периоде: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Акмола, 1994.
14. Федотов В. П., Садовникова И. В., Чернушкина А. В. // Пробл. эндокринологии. — 1992. — № 5. — С. 12—17.
15. Яглов В. В. // Арх. анат. — 1989. — № 1. — С. 14—29.
16. Coolson R. // Stain Technol. — 1966. — Vol. 41. — P. 121—129.
17. Freytag G., Russel A. // Acta Histochem. — 1971. — Bd 36. — S. 451—457.

Поступила 20.06.95

A.A. Kikimbayeva, A.P. Andreyeva, A.B. Aubakirov, A.N. Bazhanov, A.S. Lebedev - HISTOFLUOROMETRIC ASSESSMENT OF INSULIN CONTENT IN THE ENDOCRINE TISSUE OF THE RAT PANCREAS IN THE POSTREANIMATION PERIOD

Summary. Histochemical measurement of insulin was carried out in B cells of the rat pancreas after pseudoisocyanine staining of slices in various terms of the postreanimation period following 10-min clinical death after V.G. Korpachev. The studies showed that the reanimation factor enhanced insulin release into the blood and changed the morphology of islet endocrine tissue of the gland. Hypoxia promoted transformation of mixed acinar insular, acinar glandular, and ductal epithelial cells into insulin-producing cells in experimental animals. Histochemical analysis of assessing insulin content in histological preparations gives reliable data on the production of this hormone in the glandular B-cells.