

УДК 591.437+616-08+616.379-008.64

О.Р. Іванців*Кафедра анатомії людини, оперативної хірургії та топографічної анатомії
(зав. – проф. Ю.І. Попович) ДВНЗ “Івано-Франківський національний медичний університет”***КОМПЕНСАТОРНО-ВІДНОВЛЮВАЛЬНІ ПРОЦЕСИ В ОСТРІВЦЯХ ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ ЗА КОРЕКЦІЄЮ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ**

Резюме. Метою роботи було оцінити стан компенсаторно-відновлювальних процесів в острівцях підшлункової залози у інтактних щурів, при цукровому діабеті та його корекції. Тваринам моделювали абсолютну інсулінову недостатність, що відповідає цукровому діабету I типу людини, шляхом внутрішньоочеревинного високодозованого введення стрептозотоцину. З 14 доби розвитку індукованого діабету розпочинали лікування. Забір матеріалу проводили на 28, 42, 56 та 70 доби експерименту. Встановлено зниження площі острівців за рахунок зменшення середньої кількості інсуліноцитів у тварин з експериментальним цукровим діабетом. Відмічали посилення компенсаторно-відновлювальних процесів в острівцях при лікуванні ексенатидом, а також при терапії ексенатидом та інсуліном водночас, які гістологічно проявлялися частковим відновленням типової ультраструктурної організації ендокриноцитів, появою “протокових” інсуліноцитів, ацинарно-острівцевих клітин в екзокринній паренхімі, зростанням співвідношення інсуліноцитів/глюкагоноцитів та збільшенням площі острівців. При терапії інсуліном морфологічні показники достовірно не відрізнялися від таких у групі тварин з цукровим діабетом без корекції.

Ключові слова: компенсаторно-відновні процеси, острівцеві підшлункової залози, експериментальний цукровий діабет, лікування, щури.

Ультраструктура острівців підшлункової залози в нормі та при цукровому діабеті (ЦД) достатньо вивчена, проте відомості про перебіг компенсаторно-відновлювальних процесів при лікуванні ЦД різними препаратами суперечливі й неоднозначні [1-3]. Регенераційна здатність – це можливість тканини чи органу відновлюватися після пошкодження при наявності сприятливих зовнішніх чи внутрішніх тригерних факторів. Продовжується пошук лікарських форм, здатних посилювати синтетичні процеси в острівцях підшлункової залози, активуючи таким чином механізми внутрішньоклітинної регенерації [4-6]. Велику увагу дослідників привертає новий клас препаратів – міметики інкретинів, зокрема ексенатид [7]. Він посилює глюкозозалежну секрецію інсуліну і покращує синтетичні процеси в острівці при ЦД II типу, проте відсутність даних про його вплив на острівці при ЦД I типу зумовлює необхідність нашого дослідження. Для нормалізації вуглеводного обміну в якості замісної інсулінотерапії ми використали препарат інсуліну пролонгованої 24-годинної дії, зокрема інсулін гларгін [8, 9]. Він є біосинтетичним аналогом інсуліну людини, синтезованим шляхом трьох ДНК-модифікацій людського гормону, що забезпечують тривале всмоктування

препарату з місця ін'єкції, безпиковий характер дії та стабільно відтворюють глюкозознижувальний ефект не менше 1 доби.

Мета дослідження: оцінити стан компенсаторно-відновлювальних процесів в острівцях підшлункової залози у інтактних щурів, при ЦД та його корекції.

Матеріал і методи. *Всі маніпуляції із тваринами не суперечили положенням “Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей” (Страсбург, 2005), “Загальним етичним принципам експериментів на тваринах”, ухвалених П'ятим національним конгресом з біоетики (Київ, 2013) та Закону України №3447-IV “Про захист тварин від жорстокого поводження” від 21.02.2006 р.*

До експериментального дослідження включено 120 статевозрілих білих лабораторних щурів-самців, отриманих з віварію ІФНМУ (м. Івано-Франківськ). Група інтактних тварин включала 5 здорових щурів, 103 щурам моделювали абсолютну інсулінову недостатність, що клінічно відповідає ЦД I типу у людини, а 12 тваринам в еквівалентній дозі в/оч вводили тільки 0,1 М цитратний буферний розчин (по 3 щурі на кожен термін за-

© Іванців О.Р., 2016

бору). При цьому 103 тваринам одноразово в/оч вводили щойно приготовлений розчин стрептозоточину фірми Sigma (США), розведений на цитратному буфері (рН 4,5) в розрахунок 60 мг/1 кг маси тіла щура. Через 2 години після введення препарату, завдяки вибірковому uszkodженню інсуліноцитів і вивільненню великої кількості секреторних гранул в кров, у тварин відмічалася гіпоглікемія. Для попередження розвитку гіпоглікемічної коми щурів перші 48 год. поїли 10% розчином глюкози та годували солодкою їжею, а потім переводили на стандартне харчування віварію (білки 16-20%: жири 4-10%: вуглеводи 60-70%).

Із 103 тварин, яким підшкірно ввели стрептозоточин, впродовж 2 тижнів після ін'єкції загинуло 14 щурів (13,6%), також з експерименту виключили 9 тварин (8,7%), у яких на 14 добу рівень глюкози був меншим від 11 ммоль/л. У решти 80 щурів рівень глюкози коливався в межах 12-16 ммоль/л, тому цих тварин у випадковому порядку було порівно розподілено на 4 групи досліджень. У першу контрольну групу увійшло 20 тварин з ЦД, які не отримували жодного лікування. Щурам трьох наступних експериментальних груп, починаючи з 14 доби ЦД, розпочинали антидіабетичну терапію (за даними Орловського, період становлення ЦД і стабільної гіперглікемії розпочинається після перших 2 тижнів від введення стрептозоточину). 20 тварин другої експериментальної групи отримували ексенатид ("Byetta", Елі Ліллі, США) в дозі 0,04 мкг/100г/добу підшкірно ранком за 30 хвилин до годування (попередньо розвівши: на 20 мкг препарату – 20 мл фізрозчину), а 20 щурів третьої групи отримували підшкірні ін'єкції інсуліну гларгін ("Lantus Solo Star"). У четверту експериментальну групу увійшло 20 тварин, яким ранком п/ш вводили інсулін гларгін, а ввечері – ексенатид. При цьому для запобігання розвитку гіпоглікемії при комбінованій терапії двома препаратами дозу ексенатиду було зменшено вдвічі.

На початку експерименту, до навантаження стрептозоточиною і до виведення щурів із дослідження відбирали кров з хвостової вени для визначення рівня глюкози крові, шляхом нанесення поверхневих насічок в ділянці хвоста ранком натще. При цьому користувалися портативним глюкометром із стандартним набором тест-смужок "Accu-Chek Active" фірми "Roche Diagn. GH" (Нім.), а також визначали рівень глікемії глюкозооксидантним методом під час забору матеріалу. Одиниці вимірювання глюкози крові – ммоль/л. Забір матеріалу (підшлункової залози та

крові) проводили у стерильних умовах після етаназії під тіопенталовим наркозом шляхом деканітації на 28-у, 42-у, 56-у та 70-у доби розвитку індукованого діабету (по 5 тварин та кожен термін забору). Тіопентал вводили внутрішньом'язово в дозі 0,1 мл на 100 г маси тіла щура, попередньо розвівши вміст флакону (1 г сухої речовини) у 10 мл 0,9% NaCl.

Фіксацію матеріалу, виготовлення парафінових і епонових блоків та забарвлення зрізів виконували у відповідності до уніфікованих методик [10-11]. Ідентифікацію структурних компонентів підшлункової залози проводили відповідно до гістологічної термінології [12]. Визначали середню кількість острівців на 1 мм², середню площу острівців (мкм²), середню кількість інсуліноцитів, глюкагоноцитів та їх співвідношення [13, 14].

Результати дослідження та їх обговорення.

У інтактних тварин морфометричний аналіз стану острівців підшлункової залози показав, що середня кількість острівців на 1 мм² становила 6,60±1,62, середня площа острівців – (7230,5±845,60) мкм², а співвідношення інсуліноцитів/глюкагоноцитів становило 4,52±0,81. У групі тварин з ЦД без лікування, внаслідок токсичної дії стрептозоточину на ендокринні клітини, відмічалася зменшення середньої кількості острівців на 1 мм² на 28-у, 42-у, 56-у та 70-у доби експерименту відповідно у (4,43; 4,37; 4,40; та 4,40) рази та зменшення середньої площі острівців у (1,47; 1,44; 1,36 та 1,27) рази порівняно з інтактними тваринами (рис. 1, 2). Таке зменшення площі острівців відбувалося в основному за рахунок апоптозу інсуліноцитів. Відомо, що білок Bcl-2, який брав участь у регуляції апоптозу, виявлений лише у пренатальному та не виявляється в постнатальному періоді життя щурів [4].

Співвідношення інсуліноцитів/глюкагоноцитів у тварин з ЦД ставало меншим за рахунок зме-

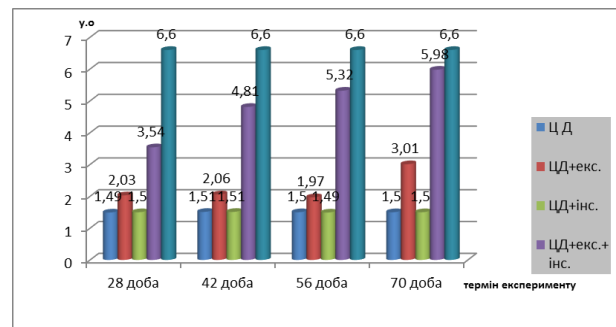


Рис. 1. Динаміка середньої кількості острівців підшлункової залози на 1 мм² у інтактних щурів, при цукровому діабеті та його корекції

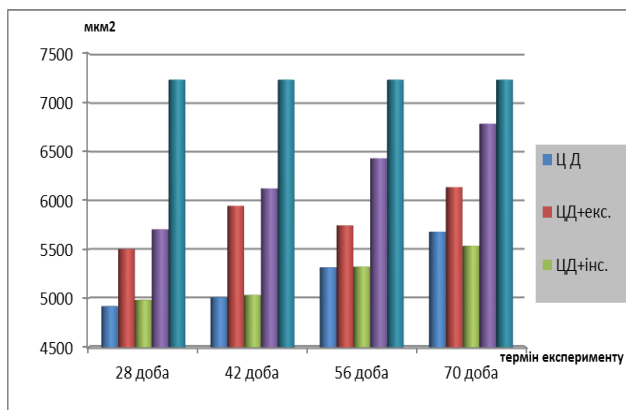


Рис. 2. Динаміка середньої площі островців підшлункової залози у інтактних щурів, при цукровому діабеті та його корекції (мкм²)

нення кількості ендокринних клітин, у цитоплазмі яких візуалізувалися секреторні гранули з світлим обідком, на 28-у, 42-у, 56-у та 70-у доби експерименту відповідно у (1,55; 2,09; 1,67; 1,45) рази (рис. 3). Крім того, внаслідок зростання рівня глюкози крові у тварин з ЦД без лікування, важливим чинником, який вплив на дисфункцію інсуліноцитів була глюкозотоксичність. Доведено, що гіперглікемія, викликана стрептозотоцином, зумовлювала каскад морфофункціональних порушень в секреторних гранулах та знижувала чутливість плазмолемі ендокринних клітин. Зменшується і концентрація Glut-2 на поверхні плазмолемі, тому нівелюються відрегульовані механізми стимуляції секреції інсуліну [4].

Отже, у групі тварин з ЦД без корекції відмічалася поетапність морфологічних змін: на 28-у добу спостерігалися ознаки вакуольної дистрофії в інсуліноцитах, починаючи з 42-ї доби малі вакуолі в цитоплазмі подекуди зливалися в більші, а вже на 56-70 доби експерименту відмічено ознаки балонної дистрофії.

У динаміці лікування ексенатидом можна виділити 2 фази: 1) фаза посилення відновних процесів (28-42 доби експерименту), яка морфометрично проявлялася збільшенням середньої кількості островців на 28-у та 42-у доби експерименту відповідно на 38,3% та 36,4%, середньої площі островців на 11,9% та 18,7%, зростанням співвідношення інсуліноцитів/глюкагоноцитів на 6,2% та 26,1% порівняно з групою без лікування ЦД (див. рис. 1-3). Ультраструктурно відмічали появу малих островців поблизу проток, ацинарно-острівцевих клітин в екзокринній паренхімі і часткове відновлення типової ультраструктурної організації ендокриноцитів підшлункової залози. Такі позитивні зміни ультраструктури при введенні ексенатиду можна пояснити частковим покращенням

вуглеводного обміну та, за даними деяких авторів, стимуляцією проліферації інсуліноцитів шляхом посилення глюкозозалежної секреції інсуліну при дії ексенатиду [5, 7]; 2) фаза відносної компенсації (56-70 доби експерименту), при якій середня кількість островців на 56-у добу зменшувалася порівняно з попереднім терміном лікування і становила $1,97 \pm 0,25$ (мм)², а середня площа островців становила на 56-у добу ($5743,56 \pm 481,37$) мкм² порівняно з ($5943,43 \pm 357,27$) мкм² на 42-у добу лікування. Поодинокі ендокриноцити відновлювали свою типову будову, проте у більшості інсуліноцитів залишалися дезорганізовані секреторні гранули, виявлялися автофаголізосоми в цитоплазмі. Такі зміни в островцях зумовлені зменшенням гіпертрофії ендокриноцитів та частковим виснаженням внутрішньоклітинних органел тривалий час синтезувати велику кількість інсуліну у відповідь на гіперглікемію [4].

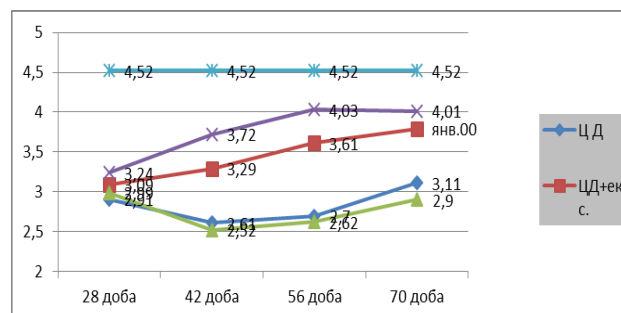


Рис. 3. Динаміка співвідношення інсуліноцитів/глюкагоноцитів в островцях підшлункової залози у інтактних щурів, при цукровому діабеті та його корекції

При лікуванні щурів з ЦД методом замісної інсулінотерапії шляхом підшкірного введення інсуліну гларгін нами не було виявлено достовірної відмінності морфометричних показників: середньої площі островців, (мкм²), середньої кількості островців на 1 см², співвідношення інсуліноцитів/глюкагоноцитів від групи тварин з ЦД без корекції відповідно до термінів експерименту (див. рис. 1-3). Проте гістологічно в структурній організації островців підшлункової залози при тривалому введенні інсуліну в якості замісної терапії стрептозотоцинового цукрового діабету відмічали значне сповільнення дистрофічних процесів порівняно з нелікованими тваринами. Доказом цього є зменшення внутрішньоклітинного набряку інсуліноцитів та сповільнення прогресування вакуольної дистрофії ендокриноцитів у більшості островців підшлункової залози. Таке сповільнення прогресування та часткова стабілізація захворювання при введенні інсуліну зумовлена, перш за все, нормалізацією рівня глюкози крові порівняно з такими у нелікованих тварин.

У групі тварин з ЦД, яким проводилася комбінована терапія двома досліджуваними препаратами в динаміці лікування ми відмітили збільшення тривалості 1) фази посилення синтетичних процесів з 28-ї до 56-ї доби експерименту. При цьому середня кількість острівців на 28-у, 42-у, 56-у доби експерименту зростала відповідно у (1,73; 2,33; 2,70) рази, а середня площа острівців збільшувалась на 3,7%; 2,9%; 11,9% порівняно тваринами, яким ЦД лікували ексенатидом (див. рис. 1-2). В екзокринній частині підшлункової залози при медикаментозному лікуванні відмічали наявність поодиноких ацинарно-острівцевих клітин [4], в цитоплазмі візуалізувалися гранули зимогену і секреторні гранули В типу та відмічалися поодинокі протокові інсуліноцити, що може бути доказом компенсаторно-відновних процесів; 2) фаза відносної компенсації розпочиналася з 70-ї доби рівень глюкози в крові тварин становив $(7,01 \pm 0,36)$ ммоль/л (що у 2,34 рази менше порівняно з нелікованими щурами), середня кількість острівців на 1 мм^2 становила $- 5,98 \pm 0,81$, а середня площа острівців $- (6781,17 \pm 932,15) \text{ мкм}^2$, співвідношення інсуліноцитів/ глюкагоноцитів $- 4,01 \pm 0,18$. Проте в деяких інсуліноцитах зберіга-

лися дегенеративні зміни: в їх ядрах збільшений вміст гетерохроматину, цитоплазма оптично щільна, зменшені розміри клітин і кількість секреторних гранул, наявні численні вакуолі невеликих розмірів.

Висновки. 1. Під впливом лікування ексенатидом, а також ексенатидом та інсуліном відмічали посилення компенсаторно-відновлювальних процесів, які проявлялися частковим відновленням острівців підшлункової залози, збільшенням середньої площі острівців (мкм^2), середньої кількості острівців на 1 мм^2 , зростанням співвідношення інсуліноцитів/ глюкагоноцитів порівняно з контролем. 2. У динаміці лікування даними препаратами нами було виділено дві фази: посилення синтетичних процесів та відносної компенсації. 3. При лікуванні щурів з ЦД інсуліном не було виявлено достовірної відмінності морфометричних показників в острівцях порівняно з тваринами без лікування.

Перспективи подальших досліджень. В подальшому планується встановити вплив медикаментозних середників (ексенатиду та інсуліну) на стан про- та антиоксидантної системи щурів з стрептозотоциновим цукровим діабетом.

Список використаної літератури

1. Вплив окситоцину на стан бета-клітин острівців Лангерганса і показники вуглеводного обміну в інтактних щурів і щурів з діабетом / Ю.М. Колесник, С.Д. Тржецинский, А.В. Абрамов [та ін.] // *Фізіолог. ж.* – 2000. – Т. 46, № 1. – С. 37-43.
2. Вплив тривалого введення глутамату натрію на структуру підшлункової залози щурів / І.В. Леценко, В.Г. Шевчук, Т.М. Фалалєєва, Т.В. Берегова // *Фізіолог. ж.* – 2012. – Т. 58, № 2. – С. 59-65.
3. Вплив препаратів із ксеногенної підшлункової залози на рівень глікемії і вільнорадикальні процеси у щурів з експериментальним цукровим діабетом / С.С. Гальченко, І.В. Белочкіна, А.В. Мамонтова [та ін.] // *Мед. хімія.* – 2004. – Т. 6, № 4. – С. 63-67.
4. Селезнева Е.В. *Современные представления о морфогенезе и регенерации островкового аппарата поджелудочной железы* / Е.В. Селезнева // *Вестн. неотложной и восстановительной мед.* – 2005. – Т. 6, № 1. – С. 151-154.
5. Kim B.M. *Clustern expression during regeneration of pancreatic islet β -cell in streptozotocin-induced diabetic rats* / B.M. Kim, Y.M. Nam, Y.J. Shin // *Diabetologia.* – 2001. – Vol. 44, № 12. – P. 2192-2202.
6. Trucco M. *Regeneration of the pancreatic β -cell* / M. Trucco // *J. Clin. Invest.* – 2005. – Vol. 115, № 1. – P. 5-12.
7. *Pharmacokinetic / pharmacodynamic studies on exenatide in diabetic rats* / X.G. Li, L. Li, X. Zhou, Y. Chen [et al.] // *Acta Pharmacol. Sin.* – 2012. – Vol. 33, № 11. – P. 1379-1386.
8. *Diabetes Prevention Trial – Type 1 Diabetes Study Group. Effects of insulin in relatives of patients with type 1 diabetes mellitus* // *N. Engl. J. Med.* – 2002. – Vol. 346, № 22. – P. 1685-1691.
9. Porcellatti F. *Better long term glycemic control with the basal insulin glargine as compared with NPH in patients with Type 1 diabetes mellitus given meal-time lispro insulin* / F. Porcellatti, P. Rossetti, S. Pampanelli // *Diabet. Med.* – 2004. – Vol. 21, № 11. – P. 1213-1220.
10. *Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині* / Л.В. Беркало, О.В. Бобович, Н.О. Боброва [та ін.]. – Полтава: Полімет, 2003. – 320 с.
11. *Патоморфологія та гістологія: атлас* / за ред.: Д.Д. Зербіно, М.М. Багрія, Я.Я. Боднара, В.А. Діброви. – Вінниця: Нова Книга, 2016. – 800 с.
12. *Гістологічна термінологія. Міжнародні терміни з цитології та гістології людини* / Федеративний міжнародний комітет з анатомічної термінології: Переклад з англ. вид.; *Гістологічна термінологія. Міжнародні терміни з цитології та гістології людини.* – К.: Медицина, 2010. – 304 с.
13. *Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия: руководство* / Г.Г. Автандилов. – М.: Медицина, 1990. – 384 с.
14. *Іващук С.І. Спосіб морфометричного дослідження частин підшлункової залози* / С.І. Іващук, В.П. Сілко, М.А. Курікеру // *Клін. анатом. та оператив. хірург.* – 2013. – Т. 12, № 4. – С. 95-97.

КОМПЕНСАТОРНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В ОСТРОВКАХ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ КОРРЕКЦИИ САХАРНОГО ДИАБЕТА

Резюме. Целью работы было оценить состояние компенсаторно-восстановительных процессов в островках поджелудочной железы у интактных крыс, при сахарном диабете и его коррекции. Животным моделировали абсолютную инсулиновую недостаточность, соответствующую сахарному диабету I типа человека. С 14 суток развития индуцированного диабета начинали лечение. Забор материала проводили на 28, 42, 56 и 70 сутки эксперимента. Установлено снижение площади островков за счет уменьшения среднего количества инсулиноцитов у животных с экспериментальным сахарным диабетом. Отмечали усиление компенсаторно-восстановительных процессов в островках при лечении эксенатидом, а также при терапии эксенатидом и инсулином одновременно, которые гистологически проявлялись частичным восстановлением типичной ультраструктурной организации эндокриноцитов, появлением “протоковых” инсулиноцитов, ацинарно-островковых клеток в экзокринной паренхиме, ростом соотношения инсулиноцитов/глюкагоноцитов и увеличением площади островков. При терапии инсулином морфологические показатели достоверно не отличались от таковых в группе животных с сахарным диабетом без коррекции.

Ключевые слова: компенсаторно-восстановительные процессы, островок поджелудочной железы, экспериментальный сахарный диабет, лечение, крысы.

COMPENSATORY RESTORATIVE PROCESSES IN THE PANCREATIC ISLETS IN CORRECTION OF DIABETES MELLITUS

Abstract. The aim of the study was to assess compensatory restorative processes in the pancreatic islets in intact rats with diabetes and correction of the disease. Absolute insulin deficiency, corresponding Type I diabetes was modeled in animals. Treatment was started from the 14th day of induced diabetes development. Collection of samples was performed on the 28th, the 42nd, the 56th and the 70th days of the experiment. The decrease of islets area at the expense of reduced number of insulinocytes in animals with experimental diabetes mellitus was found. The increase in compensatory restorative processes in the islets in the treatment with Exenatid was noted. In the treatment with Exenatid and insulin simultaneously, histologically manifested as partial restoration of typical ultrastructural arrangement of endocrinocytes and also the appearance of “ductal” beta cells, acinar-islet cells in the exocrine parenchyma, the increase of ratio of beta and alpha cells and the increase islet’s area were noted. In insulin therapy the morphological parameters were not significantly different from those in the group of animals with diabetes without treatment.

Key words: compensatory restorative processes, pancreatic islet, experimental diabetes, treatment, rats.

SHEE “Ivano-Frankivsk National Medical University” (Ivano-Frankivsk)

Надійшла 07.03.2016 р.

Рецензент – проф. Давиденко І.С. (Чернівці)