

УДК 611.13/.14+611.38.018.2]:612.433'349
DOI: 10.24061/1727-0847.18.3.2019.2

Г.В. Лук'янцева, О.М. Слободян*

*Кафедра медико-біологічних дисциплін (зав. – проф. В.А. Пастухова) Національного університету фізичного виховання і спорту України, м. Київ; *кафедра анатомії, топографічної анатомії та оперативної хірургії (зав. – проф. О.М. Слободян) Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет», м. Чернівці*

МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ПРОЦЕСИ В КРОВОНОСНИХ СУДИНАХ І СПОЛУЧНІЙ ТКАНИНИ БРИЖІ ЩУРІВ ПІСЛЯ ВПЛИВУ ПАНКРЕАТИЧНОГО ГОРМОНУ АМІЛІНУ

Резюме. На експериментальній моделі встановлено, що поліпептидний панкреатичний гормон амілін потужно знижує секреторну реактивність тучних клітин брижі білих лабораторних щурів у відповідь на дію активаторів ацетилхоліну і брадикініну в умовах *in vitro*. При вивченні потенційного вазоактивного впливу аміліну з'ясували, що він володіє вираженими вазодилататорними властивостями по відношенню до брижової артерії щурів, що може призводити до покращення умов мікроциркуляції у дистальних відділах шлунково-кишкового тракту. Стабілізація секреторної реактивності тучних клітин і модуляція скоротливої активності судин мікроциркуляторного русла під впливом аміліну можуть бути одними з механізмів реалізації його противиразкового ефекту, встановленого раніше.

Ключові слова: амілін, брижа, тучні клітини, брижова артерія.

Амілін – поліфункціональний панкреатичний пептидний гормон, який секретується спільно з інсуліном β -клітинами острівців Лангенгарса підшлункової залози. Його біологічні ефекти можна розділити на внутрішньо- і зовнішньопанкреатичні, всі вони є наслідком паракринної, гормональної і центральної дії аміліна [1]. Специфічні амілінові рецептори знаходяться у цілому ряді органів і тканин – у мозку, скелетних м'язах, легеневої тканині, ендотелії, а також у слизовій оболонці шлунка та інших відділів травної системи [2, 3]. Амілін функціонально взаємодіє з іншими метаболічно активними гормонами, такими як холецистокінін, лептин, естрадіол; фізіологічно він регулює гомеостаз глюкози, пригнічуючи секрецію інсуліну і глюкагону; доведено, що він потужно знижує рівень кальцію в крові, а також впливає на діяльність серця [4, 5]. Крім того, амілін модулює відчуття голоду і насичення, гальмує спорожнення шлунка, впливає на пам'ять та інші прояви вищої нервової діяльності [6].

Раніше на декількох експериментальних моделях утворення виразок нами був доведений виражений лікувальний і протективний противиразковий ефект аміліну, опосередкований зниженням секреції кислоти у шлунку, посиленням скоротливої активності лімфатичних судин та його проти-запальною дією [7]. Однак на даний час остаточно не встановлені усі можливі механізми, завдяки яким амілін реалізує свій антиульцерогенний ефект.

Мета дослідження: з'ясувати особливості впливу аміліну на морфофункціональні процеси в

кровеносних судинах і клітинних елементах сполучної тканини брижі щурів.

Матеріал і методи. Представлене дослідження проведено на білих безпородних статевозрілих щурах-самцях, з вихідною масою тіла 200 ± 10 г. Постановка експерименту була проведена відповідно до міжнародних принципів Гельсінської декларації «Про гуманне ставлення до тварин», прийнятої Генеральною асамблеєю Всесвітньої медичної асоціації (2000) і «Спільними етичними принципами експериментів над тваринами», затвердженими I Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001). Утримання і маніпуляції над лабораторними щурами проводилися відповідно до правил, встановлених «Європейською конвенцією з захисту хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) [8].

Для з'ясування можливості безпосереднього впливу аміліна на мастоцити, або тучні клітини (ТК) були виконані експерименти *in vitro*. Для цього у щурів після декапітації препарували зразки брижі, які інкубували впродовж 15 хвилин в розчинах аміліна або в фізіологічному розчині (контроль). В іншій серії дослідів препарати інкубували 10 хвилин в фізіологічному розчині і 10 хвилин в активаторі ТК або 10 хвилин в розчині аміліна ($2 \cdot 10^{-9}$ М) і 10 хвилин в активаторі. У якості активаторів використовували ацетилхолін і брадикінін. Контрольні зразки тканини розміщували відповідно на 20 хвилин у фізіологічний розчин. Після цього готували плівкові препарати і оцінювали секреторну ак-

© Лук'янцева Г.В., Слободян О.М., 2019

тивність ТК методом морфометричного аналізу [10]. Про секреторну активність ТК судили за індексом дегрануляції – відношення кількості дегранульованих клітин до загальної кількості проаналізованих клітин. Дегрануляція оцінювалася за ступенями – слабка (I), помірна (II), сильна (III). Слабка – за межами клітини 1-3 гранули; помірна – гранул за межами клітини більше, можна побачити ядро; сильна – вся клітина оточена гранулами, ядро добре видно. На кожному препараті оцінювали близько 200 ТК в 20 полях зору.

Для дослідження вазоактивного ефекту аміліна використовували методику ресстрації скорочувальної активності ізольованої брижової артерії щурів. Для цього у щурів після декапітації препарували брижову артерію 2-го порядку з невеликою частиною попередньої судини більшого діаметра (верхньої брижової артерії) довжиною близько 4,0 мм. Отриманий препарат судини проксимальним відрізком закріплювали на голці з нержавіючої сталі з внутрішнім діаметром 0,5 мм таким чином, щоб дистальний кінець судини залишався вільним. Препарат судини розміщували в установку для перфузії з постійною витратою при температурі 38°C, для перфузії використовували модифікований фізіологічний розчин Кребса-Хенселяйта, який попередньо аерували карбогеном. Про реакцію судини судили по зміні перфузійного тиску [9].

Результати дослідження та їх обговорення.

У першій серії експериментів зразки брижі щурів інкубували в розчині аміліна, а контрольні препарати – в фізіологічному розчині. Результати даних дослідів представлені у таблиці. Експеримент показав, що інкубація зразків в розчині аміліна суттєво не змінила фізіологічного стану мастоцитів. Достовірних відмінностей не виявлено ні в величині індексу дегрануляції, ні в співвідношенні кількості клітин з різним ступенем дегрануляції. Таким чином, можна припустити, що в умовах *in vitro* пептид не вказує помітного впливу на спонтанну (базальну) секреторну активність ТК.

У наступній серії експериментів ми з'ясували, чи може амілін при безпосередній дії на мастоцити знижувати їх реактивність, тобто зменшувати відповідь на дію активаторів. У якості активаторів використовували ацетилхолін і брадикінін. Для ТК брижі ацетилхолін є потужним стимулятором секреції – це видно по різкому збільшенню індексу дегрануляції ТК (див. таблицю). Збільшення відбувається в основному за рахунок збільшення кількості клітин з сильним, III ступенем дегрануляції. Преінкубація зразків в розчині аміліна достовірно запобігала стимулюючій дії ацетилхоліну. Загальний індекс дегрануляції ТК достовірно не відрізнявся від контролю. В основному зменшувалася кількість клітин з II та III ступенем дегрануляції.

Таблиця

Вплив аміліну на секреторну активність тучних клітин брижі *in vitro*

група	індекс дегрануляції%	ступінь дегрануляції, % від загальної кількості дегранульованих клітин		
1. фізіологічний розчин	49,8±3,3	75±14,1	15±3,3	10±2,1
2. амілін (10 ⁻⁹ М) на фоні фіз. розчину	41,5±2,3*	68±12,6	22±2,1	10±0,9
3. ацетилхолін (10 ⁻⁶ М) на фоні фізіологічного розчину	67,5±6,7*	41,8±3,9	27,2±3,2	31,1±2,8
4. амілін (10 ⁻⁹ М) на фоні ацетилхоліна (10 ⁻⁶ М)	50,8±3,7**	64,2±4,9	26,8±3,3	1,9±0,2
5. брадикінін (10 ⁻⁵ М) на фоні фізіологічного розчину	75,5±3,5*	38±7,6	37,2±3,3	24,7±6,5
6. амілін (10 ⁻⁹ М) на фоні брадикініна (10 ⁻⁵ М)	46±4,5**	48,6±5,6	40,6±4,8	10,9±2,1

* – засвідчує досягнення статистичної вірогідності по відношенню до групи контролю ($p < 0,05$); ** – засвідчує досягнення статистичної вірогідності по відношенню до групи інкубації з відповідним активатором на фоні фізіологічного розчину ($p < 0,05$)

Однак результати цих дослідів не дозволяють остаточно вирішити питання про те, чи зменшує амілін реактивність ТК на різні активуючі впливи. Для перевірки цих припущень ми використовували інший відомий стимулятор ТК – брадикинін (вазоактивний прозапальний медіатор пептидної природи). Схема експерименту повторювала попередню, результати представлені у таблиці 1. Брадикинін значно стимулював секреторну активність ТК, індекс дегрануляції при цьому значно збільшувався і становив більше 75 %. При цьому різко збільшувалася кількість клітин з сильним, III ступенем дегрануляції. Після інкубації препаратів в розчині аміліна активуючий вплив брадикиніна виявився значно зменшеним. Загальний

індекс дегрануляції ТК брижі практично не відрізнявся від контролю. Суттєво не змінилася і кількість клітин з сильним ступенем дегрануляції.

Проведені досліди дають можливість зробити висновок, що амілін пригнічує реакцію ТК на дію двох різних активаторів, вплив яких опосередкований різними рецепторними механізмами. Цей стабілізуючий ефект аміліна, мабуть, пов'язаний з його впливом безпосередньо на ТК брижі. Враховуючі той факт, що мастоцити в своїх гранулах містять різноманітні біологічно активні речовини (медіатори і модулятори запалення, ферменти, вазоактивні речовини тощо), ми зробили припущення, що ефект аміліну на секреторну активність мастоцитів може бути одним з механізмів

його потенційної дії на скоротливу діяльність кровоносних судин брижі.

З метою встановлення вазоактивних ефектів амеліна ми досліджували його вплив на тонус ізольованої брижової артерії щурів, яку перфузували з постійною витратою. Вихідна величина перфузійного тиску ізольованої ділянки судини при перфузії фізіологічним розчином становила $34,6 \pm 5,1$ мм рт. ст. Уведення в перфузійний розчин норадреналіну з метою створення базального симпатичного тонузу приводило до збільшення тиску в брижовій артерії в середньому до $59,3 \pm 6,9$ мм рт. ст. Надалі цю величину в кожному препараті брали за 100 %, і саме від неї розраховували всі отримані ефекти. Введення в систему перфузії амеліна викликало зменшення перфузійного тиску до $48,5 \pm 6,7$ мм рт. ст. Внаслідок того, що означені експерименти проводили в умовах постійної витрати, то зниження перфузійного тиску свідчить про розширення досліджуваної судини. Таким чином, дилатаційний ефект амеліна становив $18 \pm 2,3\%$ ($p < 0,01$). Реакція на пептид починала ро-

звиватися на 2-3 хвилині перфузії, а максимальний ефект досягався приблизно через 5 хвилин після введення амеліна в систему перфузії.

Висновки. 1. Амелін потужно знижує секреторну реактивність мастоцитів у відповідь на дію активаторів ацетилхоліну і брадикініну в умовах *in vitro*. 2. Амелін володіє вираженими вазодилатаційними властивостями по відношенню до брижової артерії щурів, що може покращувати умови мікроциркуляції у дистальних відділах травної системи. 3. Стабілізація секреторної реактивності тучних клітин і модуляція скоротливої активності судин мікроциркуляторного русла під впливом амеліну можуть бути одними з механізмів реалізації його противиразкового ефекту.

Перспективи подальших досліджень. У подальшій перспективі планується дослідження впливу амеліну на структурно-функціональні характеристики складових елементів кісткової тканини (ділянки проксимального епіфізарного хряща і пошарові гістоструктури середини діафізу).

Список використаної літератури

1. Волков ВП. Новые панкреатические гормоны: амилин (обзор литературы). *Universum: Медицина и фармакология (электрон. научн. журн.)*. 2014;11(12).
2. Hay DL, Chen S, Lutz TA, Parkes DG, Roth JD. Amylin: Pharmacology, Physiology, and Clinical Potential. *Pharmacol Rev*. 2015 Jul;67(3):564-600. doi: 10.1124/pr.115.010629.
3. Hay DL. Amylin. *Headache*. 2017 May;57 Suppl 2:89-96. doi: 10.1111/head.13077.
4. Stewart BD, Scott CE, McCoy TP, Yin G, Despa F, Despa S, Kekenus-Huskey PM. Computational modeling of amylin-induced calcium dysregulation in rat ventricular cardiomyocytes. *Cell Calcium*. 2018 May;71:65-74. doi: 10.1016/j.ceca.2017.11.006.
5. Wei L, Yan-Mei H, Yong-Chao Q, Xiao-Xi Z, Hai-Lu Z. Human Amylin: From Pathology to Physiology and Pharmacology. *Curr Protein Pept Sci*. 2019 Mar 27. doi: 10.2174/1389203720666190328111833.
6. Martinez-Valbuena I, Valenti-Azcarate R, Amat-Villegas I, Riverol M, Marcilla I, de Andrea CE, et al. Amylin as a potential link between type 2 diabetes and Alzheimer disease. *Ann Neurol*. 2019 Aug 3. doi: 10.1002/ana.25570.
7. Герман СВ, Жуйкова СЕ, Комаров ФИ, Копылова ГН, Купер ГД, Лукьянцева ГВ, и др. Панкреатический гормон амилин и целостность слизистой оболочки желудка. *Вестник РАМН*. 2001;12:34-8.
8. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe 18.03.1986. Strasbourg, 1986;52.
9. Nesterova MA, Chuiko AA, Sokolova RI, Medvedev OS. Evidence for an antihypertensive factor from the adrenal medulla of SHR modulating neurogenic vasoconstriction. *Acta Physiol Scand*, 1999;167:195-202.
10. Линднер ДП, Коган ЭМ. Тучные клетки как регулятор тканевого гомеостаза и их место в ряду биологических регуляторов. *Архив патологии*. 1997;8(42):1-5.

References

1. Volkov V.P. Novyye pankreaticheskiye gormony: amilin (obzor literatury) [New pancreatic hormones: amylin (review of literature)]. *Universum: Meditsina i farmakologiya [Internet]*. 2014 Nov [cited 2019 May 20];11(12). Available from: <http://7universum.com/ru/med/archive/item/1721> (in Russian).
2. Hay DL, Chen S, Lutz TA, Parkes DG, Roth JD. Amylin: Pharmacology, Physiology, and Clinical Potential. *Pharmacol Rev*. 2015 Jul;67(3):564-600. doi: 10.1124/pr.115.010629.
3. Hay DL. Amylin. *Headache*. 2017 May;57 Suppl 2:89-96. doi: 10.1111/head.13077.
4. Stewart BD, Scott CE, McCoy TP, Yin G, Despa F, Despa S, et al. Computational modeling of amylin-induced calcium dysregulation in rat ventricular cardiomyocytes. *Cell Calcium*. 2018 May;71:65-74. doi: 10.1016/j.ceca.2017.11.006.
5. Wei L, Yan-Mei H, Yong-Chao Q, Xiao-Xi Z, Hai-Lu Z. Human Amylin: From Pathology to Physiology and Pharmacology. *Curr Protein Pept Sci*. 2019 Mar 27. doi: 10.2174/1389203720666190328111833.
6. Martinez-Valbuena I, Valenti-Azcarate R, Amat-Villegas I, Riverol M, Marcilla I, de Andrea CE, et al. Amylin as a potential link between type 2 diabetes and Alzheimer disease. *Ann Neurol*. 2019 Aug 3. doi: 10.1002/ana.25570.

10.1002/ana.25570.

7. German SV, Zhuykova SE, Komarov FI, Kopylova GN, Kuper GD, Lukyantseva GV, et al. Pankreaticheskiy gormon amilin i tselostnost' slizistoy obolochki zheludka [Amylin pancreatic hormone and gastric mucosa integrity]. Vestnik RAMN. 2001;12:34-8. (in Russian).

8. Proceedings of the European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe; 1986 March 18; Strasbourg. Strasbourg; 1986. p. 52.

9. Nesterova MA, Chuiko AA, Sokolova RI, Medvedev OS. Evidence for an antihypertensive factor from the adrenal medulla of SHR modulating neurogenic vasoconstriction. Acta Physiol Scan, 1999;167:195-202.

10. Lindner DP, Kogan EM. Tuchnyie kletki kak regulyator tkanevogo gomeostaza i ih mesto v ryadu biologicheskikh regulyatorov [Mast cells as a regulator of tissue homeostasis and its place in the series of biological regulators]. Arhiv patologii. 1997;8(42):1-5. (in Russian).

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В КРОВЕНОСНЫХ СОСУДАХ И СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ БРЫЖЕЙКИ КРЫС ПОСЛЕ ВЛИЯНИЯ ПАНКРЕАТИЧЕСКОГО ГОРМОНА АМИЛИНА.

Резюме. На экспериментальной модели установлено, что полипептидный панкреатический гормон амилин мощно снижает секреторную реактивность тучных клеток брыжейки белых лабораторных крыс в ответ на действие активаторов ацетилхолина и брадикинина в условиях *in vitro*. При изучении потенциального vasoактивного влияния амилина выяснили, что он обладает выраженными вазодилатационными свойствами по отношению к брыжеечной артерии крыс, что может приводить к улучшению условий микроциркуляции в дистальных отделах желудочно-кишечного тракта. Стабилизация секреторной реактивности тучных клеток и модуляция сократительной активности сосудов микроциркуляторного русла под влиянием амилина могут быть одними из механизмов реализации его противовоспалительного эффекта, установленного ранее.

Ключевые слова: амилин, брыжейка, тучные клетки, брыжеечная артерия.

MORPHOFUNCTIONAL PROCESSES IN THE BLOOD VESSELS AND MESENTERY CONNECTIVE TISSUE OF RATS AFTER THE INFLUENCE OF PANCREATIC HORMONE AMYLIN

Abstract. Amylin is a multifunctional pancreatic peptide hormone that is secreted together with insulin by β -cells of the pancreatic islets of Langerhans. Specific amylin receptors are found in a variety of organs and tissues – the brain, skeletal muscle, lung tissue, endothelium, as well as the gastric mucosa and other parts of the digestive system. Amylin regulates glucose homeostasis, lowers blood calcium, inhibits gastric emptying, and affects memory and higher nervous activity. Previously, in several experimental models of ulcer formation, we have demonstrated a pronounced antiulcer effect of amylin. We have tried to identify possible mechanisms by which amylin exerts its anti-carcinogenic effect. In an experimental model, amylin was found to potently reduce the secretory reactivity of mast cells of white lab rats in response to the action of acetylcholine and bradykinin activators *in vitro*. In the study of the potential vasoactive effect of amylin, it was found that it has pronounced vasodilation properties in relation to the mesenteric artery of rats, which can lead to improvement of microcirculation conditions in the distal parts of the gastrointestinal tract. Stabilization of the secretory reactivity of mast cells and modulation of the contractile activity of the vessels of the microcirculatory bed under the influence of amylin may be one of the mechanisms to realize its antiulcer effect.

Key words: amylin, mesentery, mast cells, mesenteric artery.

Відомості про авторів:

Лук'янцева Галина Володимирівна – доктор біологічних наук, професор кафедри медико-біологічних дисциплін Національного університету фізичного виховання і спорту України, м. Київ;

Слободян Олександр Миколайович – доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри анатомії, топографічної анатомії та оперативної хірургії Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет», м. Чернівці.

Information about the authors:

Lukiantseva Galyna V. – Doctor of Biological Sciences, Professor of the Department of Medical and Biological Disciplines of the National University of Physical Education and Sports of Ukraine, Kyiv;

Slobodian Oleksandr M. – Doctor of Medical Sciences, Professor, Chief of the Department of Anatomy, Topographic Anatomy and Operative Surgery of the Higher State Educational Establishment of Ukraine «Bukovinian State Medical University», Chernivtsi.

Надійшла 24.05.2019 р.
Рецензент – проф. Олійник І.Ю. (Чернівці)