

УДК 616-092.9+616.379-008.64+616.37+616-08+615.253.349.7

Іванців О.Р.

ВПЛИВ ТРИВАЛОГО ВВЕДЕННЯ ЕКСЕНАТИДУ ТА ІНСУЛІНУ НА УЛЬТРАСТРУКТУРНУ ОРГАНІЗАЦІЮ ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТІ

ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет»

Були вивчені морфологічні зміни підшлункової залози, які розвивалися при експериментальному цукровому діабеті (ЕЦД) та його лікуванні інсуліном і ексенатидом, тривале введення яких морфологічно проявлялося покращенням вуглеводного обміну і посиленням відновних процесів у острівцях підшлункової залози. Підтвердження цього є зростання середньої площі острівців (мкм^2), середньої кількості острівців на 1 мм^2 , співвідношення інсуліноцитів/глюкагоноцитів впродовж експерименту і часткове відновлення типової ультраструктурної організації ендокриноцитів острівців підшлункової залози.

Ключові слова: острівцеві підшлункової залози, інсуліноцит, глюкагоноцит, лікування, інсулін та ексенатид.

Дослідження, висвітлені у статті, є фрагментом науково-дослідної роботи (НДР) кафедри анатомії людини, оперативної хірургії та топографічної анатомії «Оптимізація комплексного лікування морфологічних ушкоджень травної, ендокринної та сечостатевої систем при цукровому діабеті» (№ держ. реєстрації 0113U000769), що проводиться згідно плану виконання комплексних НДР Івано-Франківського національного медичного університету.

Вступ

Ураження острівців підшлункової залози, при яких зменшується кількість інсуліноцитів, останнім часом набуло значного поширення і на сьогоднішній день посідає 3 місце після серцево-судинних та онкологічних захворювань [2, 6]. Доведено, що політерапія цукрового діабету з використанням різних фармакологічних груп зарекомендувала себе краще, ніж монотерапія [8-11]. Ми уже вивчали вплив ексенатиду на перебіг ЕЦД [4], який ультраструктурно проявлявся посиленням синтетичних процесів в ендокриноцитах, проте значного покращення вуглеводного обміну ми не спостерігали. Тому для корекції останнього було вирішено додатково вводити пролонгований інсулін гларгін, що повинно сприяти поліпшенню протікання захворювання і відновленню структури острівців.

Мета роботи

Метою роботи було встановити особливості ультраструктурних змін підшлункової залози при експериментальній терапії стрептозотоцинового цукрового діабету щурів ексенатидом та інсуліном.

Об'єкт і методи дослідження

Експеримент проведений на 20 щурасамцях лінії Вістар, яких утримували у стандартних умовах віварію навчально-наукової лабораторії морфологічного аналізу ІФНМУ. Утримання тварин та експерименти проводилися відповідно положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 2005), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених П'ятим національним конгресом з біоетики (Київ, 2013).

Щурів розподілено на дві групи: I контрольну ($n=10$) – тварини з ЕЦД; II експериментальну ($n=10$) – тварини з ЕЦД, яким з 14 доби експе-

рименту розпочинали медикаментозну терапію індукованого стрептозотоцином діабету [5]. Для цього піддослідним тваринам ранком п/ш вводили інсулін гларгін (Лантус), а ввечері – ексенатид (Баста). Перерахунок середньотерапевтичної лікувальної дози препаратів на масу тіла щурів проводили за константами біологічної активності кожного з них [3]. Забір матеріалу для дослідження відбувався на 56 та 70 доби експерименту. Для гістологічного дослідження підшлункову залозу фіксували в 10% розчині нейтрального формаліну, виготовляли парафінові блоки, на мікротомі робили зрізи товщиною 5 мкм , після їх забарвлення вивчали під світловим мікроскопом МС 300 і фотографували за допомогою цифрової камери для мікроскопу DCM 900. Для електронномікроскопічного дослідження матеріал фіксували в 2,5% розчині глутарового альдегіду протягом 24 годин, виготовляли епонові блоки, ультратонкі зрізи робили на мікротомі TESLA BS 490 A, контрастування зрізів здійснювали в 4% розчині уранілацетату при температурі $+4^{\circ}$, вивчали під мікроскопом ПЕМ-125 К, виготовляли електроннограми. Ідентифікацію гістоструктур підшлункової залози проводили у відповідності з гістологічною термінологією [1]. Морфометрично оцінювали середню кількість острівців на 1 мм^2 , середню площу острівців (мкм^2), середню кількість інсуліноцитів, глюкагоноцитів та їх співвідношення. Значення отриманих результатів статистично опрацьовували.

Результати дослідження та їх обговорення

У всі терміни експерименту гістологічна картина підшлункової залози характеризується однотиповою будовою екзокринної частини, що представлена часточками, розділеними міжчасточковими перегородками. Ациноси, які входять до складу часточок, утворені центроацинозними клітинами та екзокриноцитами, цитоплазму яких

можна розмежувати на базальну (ядровмісна зона) та апікальну (зимогенна зона) частини (рис. 1). Система вивідних проток представлена вставними, внутрішньочасточковими, міжчасточковими, екскреторними протоками, що зливаються у протоку підшлункової залози. Острівці підшлункової залози в сукупності належать до ендокринної частини, клітини якої синтезують гормони і відіграють важливу роль в регуляції метаболізму.

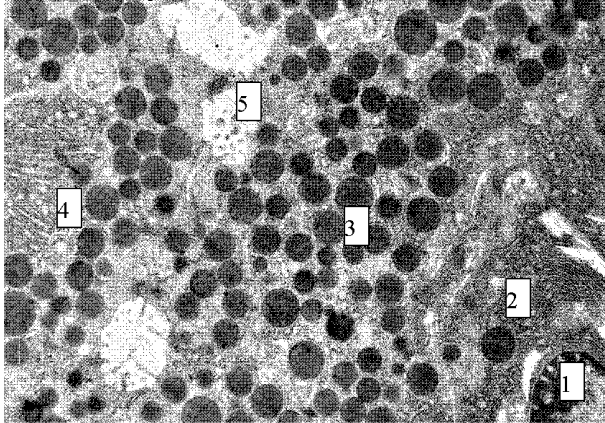


Рис. 1. Ультраструктура екзокриноцита підшлункової залози щура на 56 добу розвитку ЕЦД при лікуванні ексенатидом та інсуліном. 1 – ядро, 2 – цитоплазма, 3 – гранули зимогену, 4 – ендоплазматична сітка, 5 – вставна протока. Електроннограма. 36. x 6400.

На 56-у добу експерименту застосування ексенатиду та інсуліну в терапії цукрового діабету показало, що середня кількість острівців на 1 мм^2 складала $5,32 \pm 0,21$, а середня площа острівців – $(6428,51 \pm 798,24) \text{ мкм}^2$, співвідношення інсуліноцитів/глюкагоноцитів – $4,03 \pm 0,13$. Рівень глюкози крові, у порівнянні з нелікованими тваринами, знизився в 2,02 рази. Ультраструктурно кількість ендокриноцитів із вираженими патологічними змінами мембранних органел, порівняно з контролем, значно зменшувалась. В окремих інсуліноцитах спостерігалася вакуолізація цитоплазми, розширення цистерн гранулярної ендоплазматичної сітки, трансформація мітохондрій з деструкцією гребенів та гомогенізацією матриксу, злиття «порожніх» секреторних гранул у невеликі вакуолі. Проте більшість інсуліноцитів полігональної форми, середня кількість їх становила $68,9 \pm 0,21$. В них відмічали збереження нормальної ультраструктурної організації внутрішньоклітинних органел: велику кількість секреторних гранул В-типу в цитоплазмі, наявність лінійно видовжених мітохондрій. Електронномікроскопічна картина більшості ядер та ядерць суттєвих змін, порівняно з контролем, не зазнавала. Поряд із протоками і посеред ацинусів підшлункової залози відмічали наявність поодиноких ендокриноцитів або їх скупчення, що є свідченням посилення синтетичних процесів у щурів експериментальної групи (рис. 2).

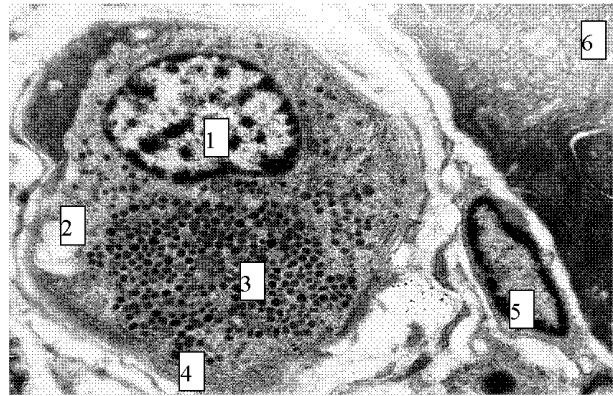


Рис. 2. Поодинокий «протоковий» ендокриноцит з численними секреторними гранулами щура на 56 добу розвитку ЕЦД при лікуванні ексенатидом та інсуліном. 1 – ядро, 2 – цитоплазма, 3 – секреторні гранули глюкагоноцита, 4 – плазмалема, 5 – фібробласт, 6 – екзокриноцит. Електроннограма. 36. x 6400.

Зміни окремих глюкагоноцитів при терапії цукрового діабету характеризувалися набуханням мітохондрій, просвітленням їх матриксу, частковим руйнуванням гребенів, неоднорідною каріоплазмою ядер, крайовою конденсацією хроматину, злиття секреторних гранул А-типу у конгломерати. Проте більшість глюкагоноцитів зберегли ознаки звичайної ультраструктурної організації, середня їх кількість у цей термін становила $17,1 \pm 0,39$. Глюкагоноцити в основному були розташовані на периферії острівця, мали більші розміри від інсуліноцитів, ядра бідніші на гетерохроматин, а ультраструктура мембранних органел наближалась до такої ж у нормі (рис. 3), тоді як у першій групі без лікування в цитоплазмі багатьох ендокриноцитів спостерігалися ознаки балонної дистрофії. При зверненні секреторних гранул контрольної групи звертали на себе увагу зменшення їх кількості та поліморфізм (переважали гранули невеликих розмірів, деякі не містили електроннощільних речовин).

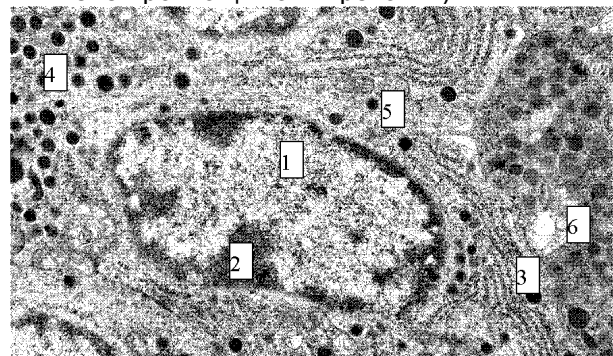


Рис. 3. Фрагмент глюкагоноцита острівця підшлункової залози щура на 56 добу розвитку ЕЦД при лікуванні ексенатидом та інсуліном. 1 – ядро, 2 – ядерце, 3 – гранулярна ендоплазматична сітка, 4 – секреторні гранули глюкагоноцита, 5 – мітохондрія, 6 – секреторні гранули соматостатиноцита. Електроннограма. 36. x 9600.

Тривале введення ексенатиду та інсуліну при ЕЦД показало, що на 70-у добу від початку експерименту рівень глюкози в крові тварин склав $(7,01 \pm 0,36) \text{ ммоль/л}$ (що у 2,34 рази менше

від контрольної групи), середня кількість островців на 1 мм² становила – 5,98±0,81, а середня площа островців – (6781,17±932,15) мкм², співвідношення інсуліноцитів/ глюкагоноцитів – 4,01±0,18. Ультраструктура більшості ендокриноцитів щурів експериментальної групи наближалася до такої ж у нормі. Більшість інсуліноцитів були розміщені компактними групами в центрі островців, в цитоплазмі візуалізувалося округле ядро, частково зміщене до одного з полюсів клітини, в нуклеоплазмі ядерця розміщені ексцентрично біла нуклеолеми з рівномірним розподілом гетеро- і еврхроматину. Поруч з ядром виявлялись елементи комплексу Гольджі, структура більшості мітохондрій збережена, в цитоплазмі наявна велика кількість секреторних гранул В-типу. На фоні міграції секреторних гранул до плазмолемі їх розміри зменшувались, що є наслідком ущільнення їх вмісту за рахунок втрати води. Проте в деяких інсуліноцитах щурів експериментальної групи зберігалися дегенеративні зміни: в ядрах збільшений вміст гетерохроматину, цитоплазма оптично щільна, зменшені розміри клітин і кількість секреторних гранул, наявні численні вакуолі невеликих розмірів. В екзокринній частині підшлункової залози при медикаментозному лікуванні відмічали наявність поодиноких ацинарно-острівцевих клітин [7], в цитоплазмі яких візуалізувалися гранули зимогену і секреторні гранули В типу, що може бути доказом компенсаторно-відновних процесів (рис. 4).

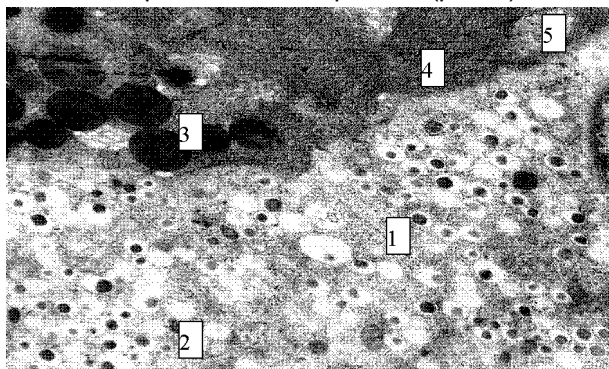


Рис. 4. Ацинарно-острівцева клітина підшлункової залози щура на 70 добу розвитку ЕЦД при лікуванні ексенатидом та інсуліном. 1 – цитоплазма, 2 – секреторні гранули, характерні для інсуліноцита, 3 – гранули зимогену, 3 – ендоплазматична сітка, 4 – мітохондрія. Електронорама. 3б. х 10000.

У щурів контрольної групи в ендокриноцитах наявні ознаки балонної дистрофії, а також посилювалася дегідратація клітин, яка морфологічно проявлялася зменшенням розмірів клітин за рахунок втрати внутрішньоклітинної рідини, ущільненням матриксу мітохондрій, зниженням кількості секреторних гранул.

Висновки

1. Тривале введення ексенатиду та інсуліну гларгін щурам з ЕЦД дозволило знизити рівень глікемії у 2,02 та 2,34 рази відповідно на 56-у та

70-у доби експерименту, в порівнянні з контрольною групою.

2. Морфометрично, відновлення островців підшлункової залози відбувалося за рахунок збільшення середньої площі островців (мкм²), середньої кількості островців на 1 мм², зростання співвідношення інсуліноцитів/глюкагоноцитів впродовж медикаментозної терапії індукованого діабету, порівняно з контролем.

3. Ультраструктурно, введення досліджуваних препаратів з 56-ї до 70-ї доби ЕЦД характеризується підсиленням процесів внутрішньоклітинної регенерації, що проявлялася відновленням типової організації переважно інсуліноцитів, появою малих островців поблизу проток, поодиноких ацинарно-острівцевих клітин серед ацинусів.

Перспективи подальших досліджень

Отримані результати не тільки розкривають деякі аспекти відновлення островців підшлункової залози при ЕЦД, що має теоретичне значення, а й можуть слугувати базою для розробки схем лікування цукрового діабету в ендокринології.

Література

1. 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.
2. Скурихин Е.Г. Дифференцировка стволовых и прогениторных В-клеток поджелудочной железы в инсулинсекретирующие клетки у мышей при сахарном диабете / Е.Г. Скурихин, Н.Н. Ермакова, Е.С. Хмелевская [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2013. - Т. 156, № 12. - С. 681-686.
3. Доклінічні дослідження лікарських засобів: методичні рекомендації / За ред. член-кор. АМН України О. В. Стефанова. – К.: Видавничий дім «Авіцена», 2001. – 528 с.
4. Іванців О.Р. Можливості відновних змін ультраструктури підшлункової залози на фоні медикаментозної корекції експериментального цукрового діабету / О.Р. Іванців // Галицький лікарський вісник. – 2015. – Т. 3, № 1. – С. 94–96.
5. Міськів В.А. Особливості будови панкреатичних островців у статевозрілих щурів та їх перебудова при експериментальному цукровому діабеті 1-типу / В.А. Міськів // Вісник проблем біології і медицини. - 2011. - Т. 2, № 2. – С. 185-187.
6. Селезнева Е.В. Современные представления о морфогенезе и регенерации островкового аппарата поджелудочной железы / Е.В. Селезнева // Вестник неотложной и восстановительной медицины. – 2005. – Т. 6, № 1. – С. 151-154.
7. Туманский В.А. Патоморфологическая характеристика перестройки ацинарно-островковой ткани при тяжелом фиброзе поджелудочной железы у больных хроническим панкреатитом / В.А. Туманский, И.С. Коваленко // Патология. - 2013. - № 2. – С. 72-77.
8. Писарев В. Б. Ультраструктурные изменения р-клеток панкреатических островков при сахарном диабете на фоне введения БАД «Диабета» / В.Б. Писарев, Г.Л. Снигур, А.А. Спасов [и др.] // Морфологические ведомости. - 2010. - № 1. - С. 78-81.
9. Якимова Т.В. Влияние галеге лекарственной на течение экспериментального сахарного диабета / Т.В. Якимова, В.Н. Булкова, Т.М. Ухова // Бюлл. сибирской медицины. – 2006. - С. 146–147.
10. Barnett A.H. Tolerability and efficacy of exenatide and titrated insulin glargine in adult patients with type 2 diabetes previously uncontrolled with metformin or a sulfonylurea: a multinational, randomized, open-label, two-period, crossover noninferiority trial / A. Barnett, J. Burger, D. Johns // Clin. Ther. - 2007. - Vol. 29. № 11. – P. 2333–2348.
11. Heine R.J. Exenatide versus insulin glargine in patients with suboptimally controlled type 2 diabetes: a randomized trial / R. J. Heine, L. F. Van Gaal, D. Johns [et al.] // Ann. Intern. Med. 2005. – Vol. 143, № 8. – P. 559–569.

References

1. Gistologichna terminologija. Mizhnarodni termini z citologii ta gistologii ljudini / Federativnij mizhnarodnij komitet z anatomichnoï terminologii: Pereklad z angl.vid.; Gistologichna terminologija. Mizhnarodni termini z citologii ta gistologii ljudini. – K. : «Medicina», 2010. – 304 s.
2. Skurihin E.G. Differencirovka stvolovyh i progenitornyh B-kletok podzheludochnoj zhelezy v insulinsekretrirujushhie kletki u myshey pri saharom diabete / E.G. Skurihin, N.N. Ermakova, E.S. Hmelevskaja [i dr.] // Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i medicyny. - 2013. - T. 156, № 12. – S. 681-686.
3. Doklinichni doslidzhennja likars'kih zasobiv : metodichni rekomendacii / Za red. chlen-kor. AMN Ukraini O. V. Stefanova. – K. : Vidavnicij dim «Avicena», 2001. – 528 s.
4. Ivanciv O.R. Možlivosti vidnovnih zmin ul'trastrukturi pidshlunkovoï zalozi na foni medikamentoznoï korekcii jeksperimental'nogo cukrovogo diabeta / O.R. Ivanciv // Galic'kij likars'kij visnik. – 2015. – T. 3, № 1. – S. 94–96.
5. Mis'kiv V.A. Osoblivosti budovi pankreatichnih ostrivciv u statevozrilih shhuriv ta ih perebudova pri jeksperimental'nomu cukrovomu diabete 1-tipu / V.A. Mis'kiv // Visnik problem biologii i medicini. - 2011. - T. 2, № 2. – S. 185-187.
6. Selezneva E.V. Sovremennye predstavlenija o morfogeneze i regeneracii ostrovkovogo apparata podzheludochnoj zhelezy / E.V. Selezneva // Vestnik neotlozhnoj i vosstanovitel'noj medicyny.– 2005. – T. 6, № 1. – S. 151-154.
7. Tumanskij V.A. Patomorfologicheskaja harakteristika perestrojki acinarno-ostrovkovoj tkani pri tjazhelom fibroze podzheludochnoj zhelezy u bol'nyh hronicheskim pankreatitom / V.A. Tumanskij, I.S. Kovalenko // Patologija. - 2013. - № 2. – S. 72-77.
8. Pisarev V. B. Ul'trastrukturnye izmenenija r-kletok pankreaticheskikh ostrovkov pri saharom diabete na fone vvedenija BAD «Diabeta» / V.B. Pisarev, G.L. Snigur, A.A. Spasov [i dr.] // Morfologicheskie vedomosti. - 2010. - № 1. - S. 78-81.
9. Jakimova T.V. Vlijanie galegi lekarstvennoj na techenie jeksperimental'nogo saharogo diabeta / T.V. Jakimova, V.N. Bulkova, T.M. Uhova // Bjull. sibirskoj medicyny. – 2006. - S. 146–147.
10. Barnett A.H. Tolerability and efficacy of exenatide and titrated insulin glargine in adult patients with type 2 diabetes previously uncontrolled with metformin or a sulfonylurea: a multinational, randomized, open-label, two-period, crossover noninferiority trial / A. Barnett, J. Burger, D. Johns // Clin. Ther. - 2007. - Vol. 29. № 11. – P. 2333–2348.
11. Heine R.J. Exenatide versus insulin glargine in patients with suboptimally controlled type 2 diabetes: a randomized trial / R. J. Heine, L. F. Van Gaal, D. Johns [et al.] // Ann. Intern. Med. 2005. – Vol. 143, № 8. – P. 559–569.

Реферат

ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ЭКСЕНАТИДА И ИНСУЛИНА НА УЛЬТРАСТРУКТУРНУЮ ОРГАНИЗАЦИЮ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

Иванцив О.Р.

Ключевые слова: островок поджелудочной железы, инсулиноцит, глюкагоноцит, лечения, инсулин и эксенатид.

Были изучены морфологические изменения поджелудочной железы, которые развивались при экспериментальном сахарном диабете и его лечении инсулином и эксенатидом, длительное введение которых морфологически проявлялось улучшением углеводного обмена и усилением восстановительных процессов в островках поджелудочной железы. Подтверждением этому является рост средней площади островков (мкм^2), среднего количества островков на 1 мм^2 , соотношения инсулиноцитов / глюкагоноцитов в течение эксперимента и частичное обновление типовой ультраструктурной организации эндокриноцитов островков поджелудочной железы.

Summary

INFLUENCE OF LONG-TERM ADMINISTRATION OF EXENATIDE AND INSULIN ON ULTRASTRUCTURAL ORGANIZATION OF PANCREAS IN MODELLED DIABETES MELLITUS

Ivanciv O.R.

Key words: pancreatic islet, beta cells, alpha cells, treatment, and insulin exenatide.

The paper describes the morphological changes of the pancreas, which developed in experimental diabetes and its therapy with insulin and exenatide whose long-term administration resulted in morphologically marked improving carbohydrate metabolism and increasing regenerative processes in pancreatic islets. This was proven by the increase in the average area of the islands (μm^2), the average number of islands per 1 mm^2 , the relationship between beta cells and alpha cells during the experiment and partial reconstruction of typical ultrastructural endocrinocytes of pancreatic islands.