

УДК: 591.437+616-08+616.379-008.64

Іванців О.Р.

Можливості відновних змін ультраструктури підшлункової залози на фоні медикаментозної корекції експериментального цукрового діабетуДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет», кафедра анатомії людини, оперативної хірургії та топографічної анатомії, м. Івано-Франківськ, Україна, iv1707r@i.ua

Резюме. Вивчені ультраструктурні і субмікроскопічні зміни в підшлунковій залозі на фоні корекції експериментального цукрового діабету (ЕЦД) ексенатидом. Цукровий діабет моделювали шляхом одноразового внутрішньоочеревинного введення стрептозоцину. В експеримент відбирали тварин з рівнем глюкози у крові 12-16 ммоль/л. З 14 доби експерименту тваринам щоденно вводили ексенатид. Гістологічні препарати забарвлювали гематоксилін-еозином, за Маллорі у нашій модифікації [4]. Використовували електронно-мікроскопічний та біохімічні методи дослідження. Визначали об'ємну частину острівців у підшлунковій залозі, долю площі, що займають інсулоцити і глюкагоноцити в острівцях. Під час розвитку ЕЦД спостерігали зменшення площі, що займають інсулоцити, зменшення площі самого острівця. На фоні щоденного введення ексенатиду відмічали позитивну динаміку відновлення площі інсулоцитів, появу окремих «протокових» інсулоцитів, спостерігали перебування клітинних елементів панкреатичного острівця: зниження гіпертрофії інсулоцитів, окремі ендокриноцити без ознак пошкодження, зменшення лімфоцитарної інфільтрації паренхіми підшлункової залози. Субмікроскопічно на фоні медикаментозної корекції відмічали стабілізацію мембран і гребенів мітохондрій, зменшення кількості каріопкнотичних ядер В-клітин. Таким чином, результати дослідження свідчать про можливість ексенатиду стимулювати регенерацію острівців Лангерганса.

Ключові слова: панкреатичні острівці, інсулоцити, глюкагоноцити, регенерація, ексенатид.

Постановка проблеми і аналіз останніх досліджень.

Незважаючи на велику увагу з боку дослідників до проблеми цукрового діабету, продовжуються пошуки ефективних препаратів, здатних підвищувати регенераторні можливості ендокриноцитів панкреатичних острівців і структурних елементів гемомікроциркуляторного русла [6-9]. Єдиний план гістологічної організації підшлункової залози у людини і щура дозволяє моделювати патологічні процеси, вивчати їх медикаментозний патоморфоз. Сучасні літературні дані свідчать про те, що ЦД розвивається при пошкодженні В-ендокриноцитів, внаслідок розвитку аутоімунних і запальних процесів, а також при порушенні балансу між процесами апоптозу і проліферації панкреатичних острівців [1-3]. В останні роки для лікування цукрового діабету II типу використовують нову групу препаратів – міметики інкретинів. Інкретини – це ендегенні інсуліноподібні пептиди, до них належить глюкагоноподібний пептид-1 (ГПП-1). Він продукується L-клітинами кишечника у відповідь на прийом їжі і стимулює глюкозозалежну секрецію інсуліну, сприяє регенерації ендокриноцитів панкреатичного острівця [8]. Використовувати нативний ГПП-1 в терапії цукрового діабету неможливо через його швидке руйнування ферментом дипептидилпептидазою-4 (ДПП-4), у зв'язку з чим був розроблений його аналог – ексенатид (Баєта, «Елі Лилли», США), резистентний до дії ДПП-4 [11]. Препарат використовують при корекції ЦД II типу, відсутність даних про застосування ексенатиду в умовах ЦД I типу у вітчизняних дослідженнях і поодинокі закордонні роботи зумовлюють необхідність дослідження.

Метою нашого дослідження було встановити особливості структурних змін підшлункової залози на фоні корекції експериментального ЦД I типу ексенатидом.

Матеріал і методи дослідження

Дослідження проводили на 20 білих безпородних щурах-самцях, яким шляхом внутрішньоочеревинного введення стрептозоцину в дозі 7 мг на 100 г маси тіла моделювали експериментальний цукровий діабет. Тварини утримувались на стандартному раціоні віварію, з дотриманням біоетичних принципів та норм. Розвиток ЦД контролювали за рівнем глюкози в крові. Тварин

розділили на дві групи: 1) діабетичний контроль (тварини з індукованим ЦД); 2) дослідна (тварини, яким з 14 доби розвитку ЦД підшкірно вводили ексенатид). В експеримент відбирали тварин з рівнем глюкози у крові 12-16 ммоль/л. Забір матеріалу проводили на 42 добу розвитку діабету. Кров для дослідження відбирали із хвостової вени. Матеріал для гістологічного дослідження фіксували в 10% розчині забуференого формаліну (pH 7,4), виготовляли парафінові блоки. Для гістологічного дослідження підшлункову залозу розподіляли на три зони: кишкову, шлункову та селезінкову. Гістологічні зрізи забарвлювали гематоксилін-еозином, за методом Маллорі у нашій модифікації для диференційованого визначення В- і А-ендокриноцитів [4]. Із епонових блоків виготовляли напівтонкі та ультратонкі зрізи. Для визначення локалізації острівців напівтонкі зрізи забарвлювали метиленовим синім. Ультратонкі зрізи контрастували уранілацетатом і сумішшю Рейнольдса та вивчали під електронним мікроскопом. Визначали об'ємну частину острівців у підшлунковій залозі, долю площі, що займають інсулоцити і глюкагоноцити в острівцях. Значення отриманих результатів оцінювали за критерієм Стьюдента.

Результати дослідження

Макроскопічно ПЗ щурів розташована інтраперитонеально, її довжина становить 3,5-4 см, а ширина 0,2-0,3 см. Через паренхіму залози частково проходить жовчна протока. Секрет підшлункової залози поступає безпосередньо в дванадцятипалу кишку, або в жовчну протоку. Синтопічно у залозі розрізняють кишкову, шлункову і селезінкову (хвостову) зони. ПЗ обох експериментальних груп макроскопічно не відрізнялась.

Мікроскопічно дослідження ПЗ показало, що вона представлена екто- та ендокринною частиною. Ацинузи (утворені панкреатоцитами і центроацинозними клітинами) та система внутрішньочасточкових і міжчасточкових вивідних проток належать до екзокринної частини залози, яка продукує травні ферменти. В апікальній зоні панкреатоцитів візуалізуються зимогенні гранули, а ядра розташовані у базальній зоні. Ендокринна частина представлена острівцями Лангерганса, які сформовані А-, В-, Д-, РР-клітинами і відіграють важливу роль у регуляції вуглеводного обміну.

На фоні розвитку ЕЦД у тварин першої експериментальної групи спостерігалися деструктивні зміни ендокриноцитів панкреатичних острівців: зменшення їх кількості, порушення контурів і форми. Ендокриноцити центральних зон острівців з численними ділянками некрозів, по периферії ендокриноцити гіпертрофовані (рис. 1).

В перинсулярній сполучній тканині на фоні розвитку ЕЦД відмічалася виражена лімфоцитарна інфільтрація. Серед В-клітин на фоні ЕЦД підвищувалась кількість дистрофічно змінених інсулоцитів. Окремі В-клітини з морфологічними ознаками вакуольної дистрофії: спостерігалась тотальна везикуляція цитоплазми інсулоцитів, поодинокі секреторні гранули з світлим обідком. Ядра набували неправильної форми, звужений перинуклеарний простір, збільшувалась кількість конденсованого хроматину, місцями визначалося порушення цілісності ядерної оболонки. Секреторні гранули були розташовані по всій цитоплазмі нерівномірно, утворюючи скупчення, подекуди зливаючись. Капіляри острівців з явищами стазу, повнокрів'ям судин, зустрічалися еритроцитарні сладжі (рис. 2).

При експериментальній терапії ЦД ексенатидом нами спостерігалось часткове відновлення панкреатичних острівців, збільшення кількості інсулоцитів, проте склеротичні зміни залишалися. Відмічалось зменшення лімфоцитарної інфільтрації, гіпертрофія інсулоцитів менш виражена, в порівнянні з першою групою (рис. 3).

Як доказ регенерації можна розглядати наявність

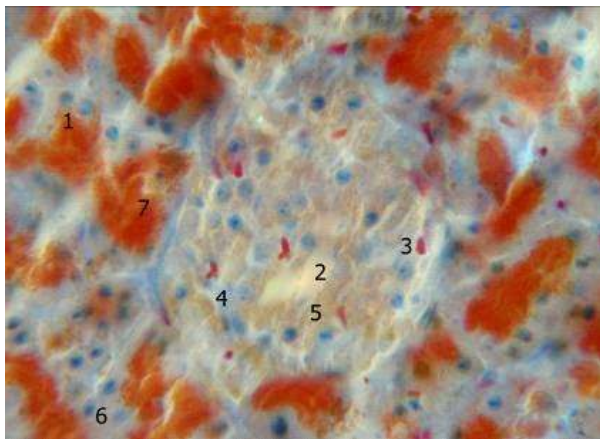


Рис. 1. Острівцеві Лангерганса щура першої експериментальної групи. Забарвлення за Маллорі. Зб.: 400.

1 – панкреатичний ацинус, 2 – ділянка некрозу у панкреатичному острівці, 3 – еритроцити у просвіті гемокапіляра, 4 – поодинокі базофільні інсулоцити (В-клітини), 5 – переважання ацидофільних глюкагоноцитів (А-клітин), 6 – ядра у базальній зоні екзокриноцитів, 7 – гранули зимогену в апікальній зоні екзокриноцитів

окремих інсулоцитів без ознак пошкодження. У цитоплазмі ендокриноцитів виявлялись мітохондрії гантелеподібної форми з численними гребенями, матрикс середньої електронної щільності, характерної для мітохондрій типової будови. Ядра ендокриноцитів округлої форми, зменшується кількість каріопікнотичних ядер. Секреторні гранули В-типу в цитоплазмі без ознак злиття, зменшилась кількість «порожніх» гранул. Відмічали появу малих острівців поблизу вивідних проток. Спостерігалась стабілізація мембран гемокапілярів, які утворені базальною мембраною та ендотеліоцитами. Із зовнішнього боку до базальної мембрани подекуди прилягають перицити. Перикапілярний простір менш розширений, ознаки стазу відсутні. Отже, ендокриноцити острівцевої тканини частково відновлювали свою типову ультраструктурну організацію, збільшувалась кількість В-клітин (рис.4).

Об'ємна доля острівців у селезінковій, шлунковій та кишковій зонах на фоні лікування, у порівнянні з першою групою, збільшувалася. У селезінковій зоні вона становила $15 \pm 0,4\%$ на фоні корекції ексенатидом в порівнянні з $12 \pm 0,9\%$ без корекції. Збільшувалась доля площі інсулоцитів у самому острівці. Так, у селезінковій та кишковій зоні цей показник збільшився в 1,6 рази, а у шлунковій – у 1,5 рази. Доля площі, яку займали глюкагоноцити в острівці в усіх

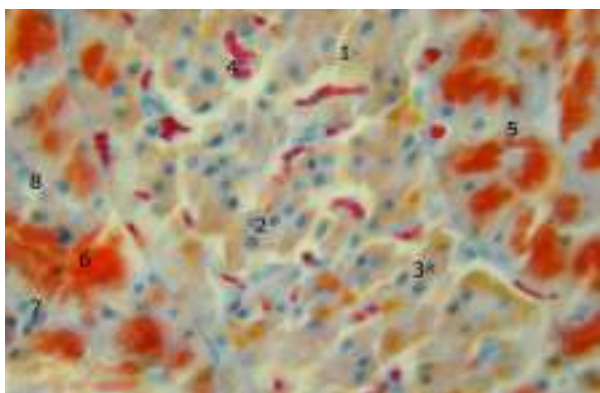


Рис.3. Панкреатичний острівцеві щура другої експериментальної групи. Забарвлення за Маллорі. Зб.: 400.

1 – ацидофільні глюкагоноцити (А-клітини), 2 – базофільні інсулоцити (В-клітини), 3 – дефінітивні ендокриноцити (Д-клітини), 4 – кровоносні капіляри острівця з еритроцитами у просвіті, 5 – панкреатичні ацинуси, 6 – зимогенні секреторні гранули в апікальній зоні екзокриноцита, 7 – ядра екзокриноцитів у базальній зоні, 8 – міжчасточкова сполучна тканина

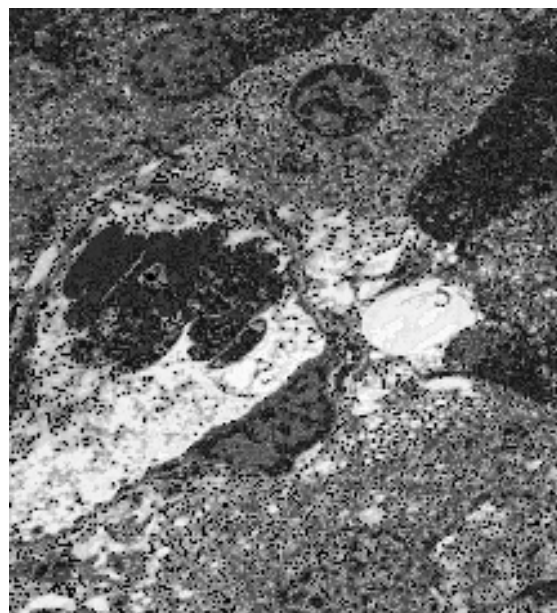


Рис. 2. Ультраструктура гемокапіляра панкреатичного острівця на фоні розвитку ЕЦД. Зб.: 4000.

1 – ядро ендотеліоцита, 2 – базальна мембрана, 3 – еритроцитарні складці, 4 – розширений перикапілярний простір, 5 – вакуолізація цитоплазми інсулоцита, 6 – секреторні гранули глюкагоноцита, 7 – мітохондрії в цитоплазмі глюкагоноцита

зонах достовірно не відрізнялася в обох експериментальних групах. Таким чином, результати дослідження свідчать, що при застосуванні ексенатиду відмічаються менш виражені ознаки пошкодження інсулоцитів, ніж без корекції.

Обговорення

Наявність ЕЦД у щурів підтверджується структурно-функціональними змінами ендокриноцитів підшлункової залози, зокрема зміною площі, яку займають інсулоцити в острівці, зменшенням розмірів і порушенням форми острівця, що співпадає з літературними даними [5]. Загальновідомо, що баланс клітинної популяції підтримується завдяки

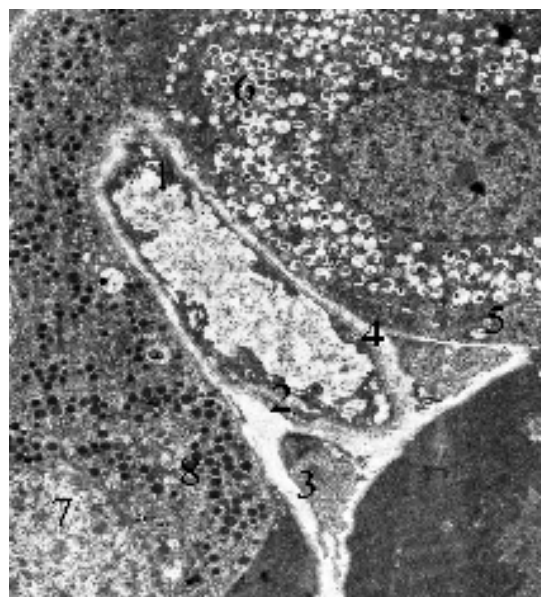


Рис. 4. Ультраструктура капіляра фенестрованого типу панкреатичного острівця на фоні медикаментозної корекції ЕЦД. Зб.: 4800.

1 – фенестрований ендотеліоцит, 2 – базальна мембрана, 3 – фібробласт, 4 – перикапілярний простір, 5 – фрагмент цитоплазми інсулоцита, 6 – секреторні гранули В-клітини, 7 – ядро глюкагоноцита, 8 – секреторні гранули А-клітини

наявності відносної рівноваги між процесами апоптозу і регенерації [10]. На фоні розвитку ЕЦД дана рівновага порушується в бік переважання процесів апоптозу і некрозу, зменшенням кількості інсулоцитів. Проте, за рахунок впливу на механізми клітинної загибелі, проліферації і диференціації В-ендокриноцитів, можливе часткове відновлення структури ендокринної паренхіми. Особливості ембріонального розвитку підшлункової залози і наявність у ній клітин-попередників є передумовами до можливої регенерації інсулоцитів шляхом неогенезу острівців Лангерганса з епітелію проток і диференціації клітин-попередників ендокриноцитів. Ексенатид сприяє регенерації В-клітин за рахунок стимуляції L-клітин гастроентеропанкреатичної ендокринної системи, які продукують ГПП-1. Отримані результати свідчать про здатність інкретинів не тільки підвищувати секрецію інсуліну, а й зменшувати швидкість апоптозу інсулоцитів, активувати їх проліферацію.

Висновок

Результати дослідження свідчать про здатність ексенатиду посилювати регенерацію ендокриноцитів підшлункової залози в умовах індукованого діабету. Використання препарату попереджує пошкодження В-клітин за рахунок впливу на механізми міжклітинних взаємодій, пов'язаних з стимуляцією проліферації, появою протокових інсулоцитів. Отже, застосування інкретинів в умовах ЦД I типу покращує загальний стан панкреатичних острівців на 42 добу ЕЦД.

Перспективи подальших досліджень у даному напрямку: планується досліджувати структурні зміни в острівцях Лангерганса на фоні медикаментозної корекції ексенатидом в різні терміни перебігу ЕЦД.

Література

1. Анциферов М. Коррекция метаболических нарушений при сахарном диабете 2 в сочетании с ожирением на фоне терапии эксенатидом / М. Анциферов, О. Котешкова, В. Ситников // Врач. – 2009. – № 5. – С. 29–33.
2. Іващук С. І. Спосіб морфометричного дослідження частин підшлункової залози / С. І. Іващук, В. П. Сілко, М. А. Курікеру / Клінічна анатомія та оперативна хірургія. – 2013. – Т. 12, № 4. – С. 95–97.
3. Кайдашев І. П. Аутоимунные повреждения панкреатических островков при сахарном диабете / И. П. Кайдашев // Клінічна імунологія, алергологія, інфектологія. – 2013. – № 1. – С. 12–15.
4. Пат. 99053 Україна, МПК G 01 N 33/00. Спосіб гістологічної ідентифікації гладких м'якоцитів судинної стінки шляхом модифікації забарвлення за Маллорі / Іванців О. Р., Багрий М. М., Попадинець О. Г., Попович Ю. І.; заявник і патентовласник Івано-Франківський національний мед. ун-т. – № u 2014 14221; заявл. 31.12.2014; опубл. 12.05.2015, Бюл. № 9.
5. Снігур Г. Л. Особенности развития апоптоза эндокриноцитов островков Лангерганса при экспериментальном сахарном диабете / Г. Л. Снігур, А. А. Спасов, М. П. Воронкова // Морфология. – 2010. – Т. 137, № 4. – С. 175.
6. Тронько Н. Д. Достижения регенеративной медицины в терапии сахарного диабета 1 типа. 1. Источники получения бета-клеток / Н. Д. Тронько, И. П. Пастер // Эндокринология. – 2012. – Т. 17, № 3. – Ч. 1. – С. 74–84.
7. 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.
8. Buse J.B.. Effects of exenatide (exendin-4) on glycemic control over 30 weeks in sulfonylurea-treated patients with type 1 diabetes Diabetes Care. [J.B. Buse, R.R.Henry, J. Han]. Diabetologia. Vol. 27. – P. 2628–2635.
9. Kim B.M. Clustern expression during regeneration of pancreatic islet b-cell in streptozotoin-induced diabetic rats. [B.M. Kim, Y.M. Ham, Y.J Shin]. Diabetologia, 2001. Vol. 44. №12. – P.2192-2202.
10. Trucco M. Regeneration of the pancreatic b-cell. [M.Trucco] J.Clin. Invest. 2005. Vol. 115. №1. – P. 5-12.
11. Viswanathan P. Exenatide therapy in obese patients with type

2 diabetes mellitus treated with insulin. [P. Viswanathan, A. Chaudhuri, R. Bhatia] Endocr. Pract. 2007. Vol. 13. №5. – P. 444–450.

Іванців О.Р.

Возможности восстановительных изменений ультраструктуры поджелудочной железы на фоне медикаментозной коррекции экспериментального сахарного диабета

ГВУЗ «Івано-Франківський національний медичинський університет», кафедра анатомії людини, оперативної хірургії і топографічної анатомії, г. Івано-Франківськ, Україна, iv1707r@i.ua

Резюме. Изучены ультраструктурные и субмикроскопические изменения в поджелудочной железе на фоне коррекции экспериментального сахарного диабета (ЭСД) эксенатидом. Сахарный диабет моделировали путем однократного внутрибрюшинного введения стрептозотоцина. В эксперимент отбирали животных с уровнем глюкозы в крови 12-16 ммоль/л. С 14 суток эксперимента животным ежедневно вводили эксенатид. Гистологические препараты окрашивали гематоксилин-эозином, по Маллори в нашей модификации. Использовали электронно-микроскопический и биохимические методы исследования. Определяли объемную долю островков в поджелудочной железе, долю площади, что занимают инсулоциты и глюкагоноциты в островках. Во время развития ЭСД наблюдали уменьшение площади, занимаемой инсулоцитами, уменьшение площади самого островка. На фоне ежедневного введения эксенатида отмечали положительную динамику восстановления площади инсулоцитов, появление отдельных «протоковых» инсулоцитов, наблюдали перестройку клеточных элементов панкреатического островка: снижение гипертрофии инсулоцитов, отдельные эндокриноциты без признаков повреждения, уменьшение лимфоцитарной инфильтрации паренхимы поджелудочной железы. Субмикроскопически на фоне медикаментозной коррекции отмечали стабилизацию мембран и крист митохондрий, уменьшение количества кариопикнотических ядер В-клеток. Таким образом, результаты исследования свидетельствуют о возможности эксенатида стимулировать регенерацию островков Лангерганса.

Ключевые слова: панкреатические островки, инсулоциты, глюкагоноциты, регенерация, эксенатид.

Ivantsiv O.R.

Peculiarities of Renewable Changes of Pancreatic Ultrastructure Against the Background of Medical Correction of Experimental Diabetes

SHEI “Ivano-Frankivsk National Medical University”, Chair of Human Anatomy, Operative Surgery and Topographical Anatomy, Ivano-Frankivsk, Ukraine, iv1707r@i.ua

Abstract. Ultrastructural and submicroscopic changes in the pancreas against the background of experimental diabetes mellitus correction (EDM) by exenatide were studied. Diabetes mellitus was modeled by a single intraperitoneal streptozotocin administration. The animals with the level of blood glucose 12-16 mmol/l were taken for the experiment. From the 14th day of the experiment the animals were injected exenatide daily. The histological preparations were stained with haematoxylin-eosin, according to Mallory in our modification [4]. Electronic-microscopic and biochemical methods of study were used. The volumetric share of islands in the pancreas, the part of the area, occupied by insulocytes and glucagonocytes in the islands, were determined. During the development of EDM the decrease of the area, occupied by insulocytes, and the reduction of the area of the island were observed. Against the backdrop of daily administration of exenatide the positive dynamics of insulocytes' area recovery, the appearance of some “ductal” insulocytes were noted, reorganization of cellular elements of pancreatic islet was observed: reduction of insulocytes' hypertrophy, some endocrinocytes with no signs of damage, reduction of lymphocytic infiltration of the parenchyma of the pancreas. Submicroscopically against the background of medical correction the stabilization of mitochondrial membranes and crests, reduction of kariopiknotic nuclei of B-cells were noted. Thus, the results of the study indicate the exenatide ability to stimulate the regeneration of islets of Langerhans.

Keywords: pancreatic islets, insulocytes, glucagonocytes, regeneration, exenatide.

Надійшла 22.06.2015 року.