

УДК: 611.814.3+577.95+ 616.379-08.64

О.Я. Жураківська

Івано-Франківський національний медичний університет

ОСОБЛИВОСТІ СТРУКТУРНОЇ ПЕРЕБУДОВИ АДЕНОГІПОФІЗА НЕСТАТЕВОЗРІЛИХ ЩУРІВ НА РАННІХ СТАДІЯХ РОЗВИТКУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ

Ключові слова: стрептозотоциновий цукровий діабет, аденогіпофіз, ендокриноцити.

Резюме. Робота виконана на 52 щурах самців лінії Вістар 1- і 3-місячного віку, 20 із яких служили контролем, а у 32 викликали експериментальний цукровий діабет шляхом внутрішньоочередового введення стрептозотоцину. На 7 і 14 доби експерименту в аденогіпофізі спостерігаються стрес-реактивні зміни у відповідь на гіперглікемію, які характеризуються достовірним збільшенням функціональної активності соматотропів і кортикотропів. Зростає площа їх ядер і ядерно-цитоплазматичний індекс, збільшується об'ємна щільність секреторних гранул у їх цитоплазмі. Такі якісні і кількісні зміни соматотропів призводять на 14-ту добу стрептозотоцинового цукрового діабету до статистично значущого зростання в крові соматотропного гормону.

Вступ

Актуальність та перспективність наукової роботи не викликає сумнівів, адже на сьогодні цукровий діабет (ЦД) називають неінфекційною епідемією ХХІ століття. В Україні зареєстровано понад 1 млн. хворих на ЦД, проте реально кількість людей з недиагностованою патологією перевищує цю цифру в 3-4 рази [3], у тому числі 7180 дітей віком до 18 років. Багато дітей, хворих на ЦД відстають у фізичному і статевому розвитку від здорових дітей [2]. Не дивлячись на велику кількість робіт, присвячених ЦД, тільки деякі з них стосуються частоти і причин виникнення порушень фізичного і статевого розвитку [2].

Мета дослідження

Встановити морфологічні зміни ендокриноцитів аденогіпофіза при експериментальному ЦД у тварин дорепродуктивного віку.

Матеріал і методи

Матеріалом дослідження послужили шматочки гіпофіза 52 щурів-самців лінії Вістар віком 1 і 3 місяці, які розподіляли на 2 групи: контрольну (20 тварин), експериментальну (32 тварини), в яких шляхом внутрішньоочередового введення стрептозотоцину (7 мг на 100 г маси тіла), розчиненого в 0,1 М цитратному буфері з рН 4,5, моделювали ЦД. Тваринам контрольної групи в еквівалентній дозі внутрішньоочередово вводили 0,1 М цитратний буфер з рН 4,5. На 7 і 14 добу

після введення стрептозотоцину забирали гіпофіз для дослідження. Розвиток цукрового діабету впродовж 14 днів контролювали за щоденним визначенням глюкози в крові, яку вимірювали із краплі крові хвостової вени за допомогою тест-полосок на глюкометрі фірми "Accu Check" (Германія). Евтаназію тварин проводили під тіопенталовим наркозом шляхом декапітації з наступним забором крові в пробірку для біохімічних досліджень. Усі експерименти виконували в повній відповідності з вимогами комісії з біоетики ДВНЗ "Івано-Франківський національний медичний університет" (протокол № 57/11 від 18 жовтня 2011 р.) та Закону України "Про захист тварин від жорстокого поводження" від 15 грудня 2009 року, № 1759-VI.

Для гістологічного дослідження шматочки гіпофіза фіксували в розчині Буена, виготовляли парафінові блоки, зрізи забарвлювали "азаном" за Генденгайном і альдегід-фуксином за Гоморі з дозбарвленням "азаном" за Гейденгайном. Для електронно-мікроскопічного дослідження шматочки матеріалу фіксували у 2% розчині чотириокису осмію, проводили та контрастували за загально прийнятим методом. Вивчення матеріалу проводили на електронному мікроскопі ПЕМ-125 К. Гістологічні препарати вивчали під світловим мікроскопом МС 300 (ТХР) та фотографували за допомогою Digital camera for microscope DCM 900.

Процес морфометрії здійснювався на вказаному фотоматеріалі за допомогою програмного

забезпечення NIH USA "Image J" (США) в ручному режимі із урахуванням збільшень. Структурні зміни на певному етапі дослідження, аналізували в 50 полях зору і визначали показники площі профільного поля різних типів ендокриноцитів і їх ядер, ядерно-цитоплазматичний індекс (ЯЦІ) (співвідношення площі профільного поля ядра до площі профільного поля цитоплазми). Секреторний процес оцінювали за показниками об'ємної щільності секреторних гра-

нул в ендокриноцитах ($V_i = P_i / Pt [1]$).

Рівень соматотропного гормону визначали в сироватці крові імуноферментним методом за допомогою набору EIA-1787 (DRG, USA).

Використовували такі методи статистичного аналізу: 1) перевірка нормальності розподілу кількісних ознак проводилася з використанням показника Колмогорова-Смірнова з поправкою Ліллієфорса і критерію Шапіро-Уїлка, а також за допомогою гістограми з лінією очікування

Таблиця 1

Морфометричні показники ендокриноцитів аденогіпофіза тварин різного віку при розвитку стрептозотоцинового діабету ($M \pm m$, $n=5$)

Ендокриноцити гіпофіза	Групи тварин	Площа ядра (мкм ²)	Площа клітини (мкм ²)	ЯЦІ
1-міс. щури (7 доба експерименту)				
соматотропи	ЦД	15,26±0,79*	32,52±0,86	0,88±0,04*
	контроль	12,72±0,66	31,29±0,62	0,68±0,03
гонадотропи	ЦД	25,86±1,52	117,56±2,42	0,37±0,02
	контроль	26,53±1,24	121,49±2,01	0,36±0,03
тиреотропи	ЦД	23,57±1,62	83,27±1,64	0,46±0,02
	контроль	24,12±1,34	81,56±1,76	0,47±0,03
кортикотропи	ЦД	33,52±1,46	165,27±4,29	0,25±0,02
	контроль	31,24±1,27	161,79±3,89	0,24±0,03
1-міс. щури (14 доба експерименту)				
соматотропи	ЦД	17,32±0,46*	32,49±0,73	1,14±0,09*
	контроль	13,54±0,68	32,84±0,69	0,71±0,03
гонадотропи	ЦД	27,53±1,34	116,49±2,21	0,34±0,02
	контроль	26,38±1,49	122,65±2,43	0,35±0,04
тиреотропи	ЦД	24,21±1,62	84,65±1,38	0,42±0,03
	контроль	24,75±1,34	81,72±1,46	0,43±0,04
кортикотропи	ЦД	40,29±1,64* [#]	164,79±4,98	0,32±0,02* [#]
	контроль	30,22±1,58	168,21±3,52	0,22±0,03
3-міс. щури (7 доба експерименту)				
соматотропи	ЦД	21,34±0,79*	43,57±0,76	0,92±0,08*
	контроль	16,43±0,84	41,08±0,85	0,69±0,06
гонадотропи	ЦД	37,56±1,24	131,85±6,37	0,36±0,07
	контроль	38,29±1,32	135,34±5,68	0,37±0,08
тиреотропи	ЦД	29,07±1,09	99,86±2,45	0,43±0,03
	контроль	28,78±1,41	97,89±2,63	0,41±0,02
кортикотропи	ЦД	35,76±0,89*	189,63±2,54	0,23±0,03*
	контроль	32,48±0,95	195,67±3,49	0,20±0,03
3-міс. щури (14 доба експерименту)				
соматотропи	ЦД	23,37±0,82*	42,08±0,58	1,25±0,08*
	контроль	16,56±0,79	41,75±0,76	0,68±0,06
гонадотропи	ЦД	36,29±1,24	131,68±6,86	0,37±0,08
	контроль	35,65±1,32	138,53±5,73	0,35±0,06
тиреотропи	ЦД	28,85±1,14	99,98±2,36	0,41±0,02
	контроль	27,98±1,09	97,27±2,45	0,42±0,03
кортикотропи	ЦД	42,57±0,98* [#]	183,93±2,54	0,31±0,02* [#]
	контроль	31,24±0,89	167,56±4,95	0,23±0,02

Примітки:

1 - різниця між показниками контролю і досліді тварин однієї вікової групи, $p < 0,05$.

2- # - різниця порівняно з показниками попереднього терміну експерименту, $p < 0,05$.

нормальної функції розподілу. Комп'ютерне опрацювання даних проводилося за допомогою статистичного пакету Stat.Soft.Inc; Tulsa, OK, USA; Statistica 6. Використовували непараметричні методи дослідження (критерій Уїлкоксона, Манна-Уїтні). Для аналізу якісних ознак (частка, відсоток) застосовували аналіз таблиць спряженості: Хі-квадрат (χ^2). Критичне значення рівня статистичної значущості приймалося рівним $p < 0,05$.

Обговорення результатів дослідження

На 7-му добу розвитку стрептозотоцинового ЦД рівень глюкози в крові 1-міс. тварин зростає до $(10,45 \pm 0,29)$ ммоль/л (контроль $(3,61 \pm 0,09)$ ммоль/л, $p = 0,000157$), у 3-міс. - до $(12,22 \pm 0,34)$ ммоль/л (контроль $(3,69 \pm 0,12)$ ммоль/л, $p = 0,000157$). Відмічається гіперемія аденогіпофіза. Спостерігається статистично значуще збільшення ядер соматотропів і їх ЯЦІ (табл. 1). У 3-міс. тварин у цей термін експерименту відмічається статистично значуще збільшення площі ядер кортикотропів і їх ЯЦІ (див. табл. 1).

У соматотропах 1- і 3-міс. тварин відмічаються структурні ознаки підвищення їх функціональної активності. Ядра соматотропів мають маргінально розташовані гранули хроматину та кругле темне ядро, яке локалізується дещо ексцентрично. Збільшується кількість цистерн гранулярної ендоплазматичної сітки (ГЕС). По всій цитоплазмі клітини відмічаються СГ, більшість із яких мають діаметр $(312,28 \pm 15,34)$ нм і матрикс високої електронної щільності (зрілі гранули), менша частина з діаметром $(254,37 \pm 12,47)$ нм і

матриком помірно електронної щільності (незрілі гранули). Кількість СГ у сусідніх клітинах є різною, зустрічаються дегранульовані клітини. Об'ємна щільність СГ достовірно збільшується (табл. 2). На фоні такої морфологічної перебудови соматотропів статистично значущих змін не встановлено.

Ультраструктура гонадотропів і тиреотропів тварин із ЦД не відрізняється від контрольної групи. Це ж стосується об'ємної щільності в них СГ (табл. 2).

У 1-міс. щурів в кортикотропах зменшується об'ємна щільність СГ у цитоплазмі (див. табл. 2). При цьому збільшується кількість СГ помірно електронно-оптичної щільності з мембраною та підмембранним світлим обідком ("haloed granules", облямовані гранули), тобто ті, що виділяють секрет.

У 3-міс. тварин, поряд із дегранульованими, зустрічаються помірно гранульовані кортикотропи. Об'ємна щільність СГ зростає (див. табл. 2), серед яких 56% становлять молоді СГ з матриком високої електронно-оптичної щільності, вкриті мембраною, 44% - дифундуючі СГ, які мають матрикс помірно електронно-оптичної щільності та розміту периферію, "haloed granules" зустрічаються досить рідко. Такі морфофункціональні зміни у кортикотропах тварин різного віку при експериментальному ЦД вказують на адаптаційно-компенсаторні процеси, які пов'язані із гіперглікемією. Розвиток стрес-реакції, що проявлялася посиленням функціональної активності кортикотропів аденогіпофіза, яка співпадала із функціональним напруженням клітин

Таблиця 2

Об'ємна щільність СГ в ендокриноцитах тварин різного віку при розвитку стрептозотоцинового цукрового діабету ($M \pm m$, %, $n=5$)

Ендокриноцити	Група тварин	1-міс. тварини		3-міс. тварини		
		Термін експерименту	7 доба	14 доба	7 доба	14 доба
гонадотропи: • світлі	ЦД		$8,17 \pm 0,23$	$7,02 \pm 0,05^*$	$11,49 \pm 0,57$	$9,18 \pm 0,37^*$
	контроль		$8,21 \pm 0,16$	$8,24 \pm 0,06$	$11,56 \pm 0,48$	$11,32 \pm 0,38$
• темні	ЦД		$10,52 \pm 0,31$	$11,03 \pm 0,25$	$15,64 \pm 0,43$	$12,78 \pm 0,37^*$
	контроль		$10,47 \pm 0,24$	$10,62 \pm 0,37$	$15,32 \pm 0,39$	$15,08 \pm 0,36$
тиреотропи	ЦД		$5,93 \pm 0,07$	$5,68 \pm 0,09$	$5,09 \pm 0,06$	$4,98 \pm 0,06$
	контроль		$5,89 \pm 0,08$	$5,72 \pm 0,08$	$5,02 \pm 0,04$	$5,12 \pm 0,07$
кортикотропи	ЦД		$2,09 \pm 0,08^*$	$3,09 \pm 0,12^*$	$4,87 \pm 0,07^*$	$6,19 \pm 0,21$
	контроль		$2,52 \pm 0,07$	$2,26 \pm 0,08$	$4,55 \pm 0,09$	$4,64 \pm 0,11$
соматотропи	ЦД		$17,32 \pm 0,64$	$19,21 \pm 0,52^*$	$17,05 \pm 0,38^*$	$19,18 \pm 0,41^*$
	контроль		$15,29 \pm 0,76$	$15,02 \pm 0,36$	$14,24 \pm 0,13$	$14,42 \pm 0,24$

Примітка. * - різниця між показниками контролю і ЦД, $p < 0,05$.

пучкової зони надниркових залоз та супроводжувалося підвищенням рівня кортизолу в периферійній крові описано іншими дослідниками при цукровому діабеті 2-го типу [5, 6].

На 14-у добу, порівняно з попереднім терміном експерименту, рівень глюкози продовжує зростати у 1-міс. тварин до $(16,26 \pm 0,39)$ ммоль/л ($p=0,000156$), у 3-міс. - до $(15,21 \pm 0,33)$ ммоль/л ($p<0,000155$). У досліджуваних групах тварин з ЦД спостерігається статистично значуще збільшення ядер соматотропів, кортикотропів і їх ЯЦІ (табл. 1).

На відміну від контрольної групи тварин, в ядрах соматотропів 1- і 3-міс. тварин із експериментальним ЦД хроматин розташований маргінально. Перинуклеарний простір розширений. Збільшується кількість і протяжність цистерн ГЕС (рис. 1). Вони є розширені і нерідко в 1-міс. тварин утворюють порожнини. На їх

поверхні міститься багато рибосом. Мітохондрії мають овальну або округлу форму, просвітлений матрикс і частково зруйновані кристи (див. рис 1б). У цитоплазмі 3-міс. тварин зустрічаються лізосомоподібні тіลця, утворені злиттям лізосом і СГ (див. рис. 1 в). Об'ємна щільність СГ у соматотропах, порівняно з попереднім терміном експерименту, зростає (див. табл. 2). Рівень соматотропного гормону в крові, порівняно з контрольною групою тварин, достовірно зростає в 1-міс. тварин до $(1,75 \pm 0,04)$ нг/мл ($p=0,0179$), у 3-міс. - до $(1,71 \pm 0,03)$ нг/мл ($p=0,0181$). Утворення лізосомоподібних тілец пов'язане із затримкою виведення соматотропного гормону із клітини, тому і відбувається руйнування секреторних гранул. Ми, як і деякі автори [4], притримуємося думки, що такі процеси пов'язані зі змінами в секреторному процесі, а саме, із незрілістю СГ, яке відбувається на фоні зниження рівня інсуліну.

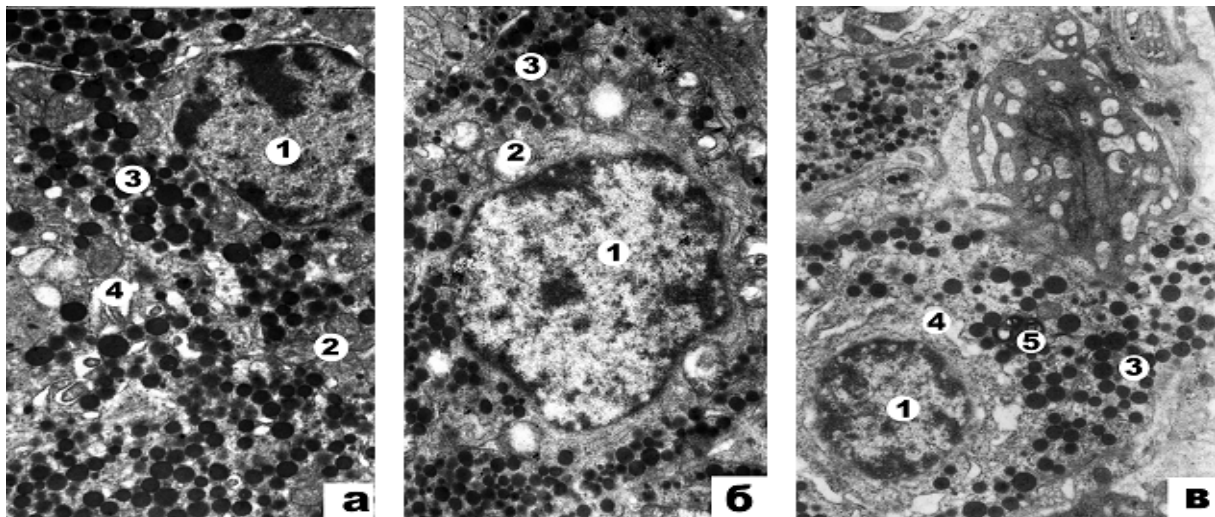


Рис. 1. Субмікроскопічні зміни соматотропів 1- (а) і 3-міс. (б, в) щурів на 14-у добу розвитку ЕЦД. Зб.: а, б, в) 8000.

1 - ядро соматотропа, 2 - мітохондрії, 3 - СГ, 4 - ГЕС, 5 - лізосомоподібні тілця.

З іншого боку дефіцит останнього може порушувати окисно-відновні процеси у різних ендокринних клітинах [4], і цим самим призводити до порушень синтезу і виведення гормонів із клітини. Деякі автори [2] вказують на підвищення базального і стимульованого рівня соматотропного гормону у дітей з інсулінозалежним ЦД в стадії субкомпенсації, і пояснюють це явище частими епізодами гіпо- і гіперглікемії у цій групі хворих, що призводить до зворотного впливу на соматотропну функцію гіпофіза.

У цей термін експерименту у світлих і темних гонадотропах 1- і 3-міс. щурів відмічається просвітлення матриксу мітохондрій та часткова деструкція їх крист. По всій цитоплазмі клітини розсіяні вільні рибосоми, полісоми і СГ високої та

помірної електронно-оптичної щільності. Об'ємна щільність останніх зменшується, порівняно з контрольними величинами (див. табл. 2).

У тиреотропах різних вікових груп в цей термін експерименту суттєвих морфологічних змін не виявлено.

У кортикотропах зростає об'ємна щільність СГ (див. табл. 2). Вони дрібні, з матриксом помірної і високої електронної щільності. При цьому "haloed granule" майже не зустрічаються. Мітохондрій мало, деякі з них представлені вакуолями, внаслідок руйнування їх крист. Цитоплазма помірної електронної щільності, містить багато цистерн ГЕС. Поряд з гіпергранульованими клітинами, зустрічаються помірно- і дегранульовані.

Висновки

В 1- і 3-місячних тварин на 7-му - і 14-ту добу розвитку експериментального ЦД в аденогіпофізі спостерігаються стрес - реактивні зміни у відповідь на гіперглікемію, які характеризуються достовірним збільшенням функціональної активності соматотропів і кортикотропів. Зростає площа їх ядер і ЯЦІ, збільшується об'ємна щільність СГ у їх цитоплазмі. Такі якісні і кількісні зміни соматотропів призводять на 14-ту добу стрептозотоцинового ЦД до статистично значущого зростання в крові соматотропного гормону.

Перспективи подальших досліджень

Дослідження морфо-функціональних змін з боку ендокриноцитів гіпофіза в більш віддалені терміни експериментального цукрового діабету, які дозволять розширити існуючі уявлення про патогенетичні механізми порушень ендокринної функції гіпофіза та стануть основою для розробки і патогенетичного обґрунтування заходів, направлених на корекцію та попередження розвитку діабетичних ендокринопатій.

Література. 1. Автандилов Г. Г. Медицинская морфометрия: руководство / Автандилов Г. Г. - М. : Медицина, 1990. - 384 с. 2. Большова Е.В. Соматотропная функция гипофиза у детей и подростков при сахарном диабете в зависимости от клинического течения заболевания / Е.В. Большова, В.В. Попова // Український медичний часопис. - 2000. - №2. - С. 128-132. 3. Деякі чинники ризику смертності на цукровий діабет першого типу в Україні, оцінені за даними загальнонаціонального реєстру / М. Д. Халангот, М. Д. Тронько, В. І. Кравченко [та ін.] // Ендокринологія. - 2010. - Т.15, № 1. - С. 62-70. 4. Anatomically specific changes in the expression of somatostatin, growth hormone-releasing hormone and growth hormone receptor mRNA in diabetic rats / S. Busiguina, J. Argente, L.M. Garc-a-Segura, J.A. Chowen // J. Neuroendocrinol. - 2000. - № 12(1). - P. 29-39. 5. High glucose-induced changes in steroid production in adrenal cells / F. Astort, E. Repetto, C. Martnez Calejman et al. // Diabetes Metab. Res. Rev. - 2009. - №25(5). - P. 477-486. 6. Hippocampal neurovascular and hypothalamic-pituitary-adrenal axis alterations in spontaneously type 2 diabetic GK rats // J. Beauquis, F. Homo-Delarche, M.H. Giroix et al. // Exp Neurol. - 2010. - № 222(1). P. 125-134.

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРНОЙ ПЕРЕСТРОЙКИ АДЕНОГИПОФИЗА НЕПОЛОВОЗРЕЛЫХ КРЫС НА РАННИХ СТАДИЯХ РАЗВИТИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА

О.Я. Журакивская

Резюме. Работа выполнена на 52 крысах самцах линии Вистар 1- и 3-месячного возраста, 20 из которых служили контролем, а в 32 моделировали экспериментальный сахарный диабет путем внутрибрюшинного введения

стрептозотоцина. На 7 и 14 сутки эксперимента в аденогипофизе наблюдаются стресс - реактивные изменения в ответ на гипергликемию, которые характеризуются достоверным увеличением функциональной активности соматотропов и кортикотропов. Увеличивается площадь их ядер и ядерно - цитоплазматический индекс, увеличивается объемная плотность секреторных гранул в их цитоплазме. Такие качественные и количественные изменения соматотропов приводят на 14 сутки стрептозотоцинового сахарного диабета до статистически значимого роста в крови соматотропного гормона.

Ключевые слова: стрептозотоциновый сахарный диабет, аденогипофиз, эндокриноциты.

FEATURES OF STRUCTURAL RECONSTRUCTION OF ADENOHYPOPHYSIS IN NOT SEXUALLY MATURE RATS AT EARLY STAGES OF EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS

O. Ya. Zhurakivska

Abstract. Scientific work is devoted to studying morpho-functional organization of the adenohipophysis in the early stages of streptozotocin-induced diabetes. For research were used adenohipophysis of 52, 1 and 3 month old male rats Wistar line. Diabetes mellitus was modeled by single intraperitoneal administration of streptozotocin at a dose of 7 mg per 100 g. of body weight and material was taken on the 7th and 14th days of the experiment. Histochemical ("Azan" by Hendenhayn and aldehyde-fuchsin by Gomori with additional staining with "Azan" by Hendenhayn) and electron microscope methods were used. It was established that on the 7th and 14th day from the beginning of modeling of streptozotocin-induced diabetes stress-reactive morphological changes in response to hyperglycemia, which are characterized by a significant increase in functional activity of somatotropes and corticotropes were observed in adenohipophysis. The area of nuclear and nuclear-cytoplasmic index grows volume density of secretory granules in their cytoplasm increases. Throughout the whole cytoplasm of somatotropes secretory granules are observed, most of which have a diameter of $312,28 \pm 15,34$ nm and high electron density matrix (mature granules), smaller part with a diameter of $254,37 \pm 12,47$ nm and moderate electron density matrix (immature granules) lysosomelike corpuscles are found formed by merging of lysosomes and secretory granules, that indicates on a delayed removal of secretion from the cell. These qualitative and quantitative changes of somatotropes lead on the 14th day of streptozotocin-induced diabetes to a statistically significant increase in the blood of somatotropin. But in light and dark gonadotropes on the 14th day of experimental diabetes mellitus destructive changes of mitochondria and structural elements of the Golgi complex are observed, a significant decrease in the volume density of secretory granules in their cytoplasm, that indicates on a decrease in their functional activity.

Key words: streptozotocin-induced diabetes mellitus adenohipophysis, endocrinocytes.

Ivano-Frankivsk National Medical University

Clin. and experim. pathol. - 2014. - Vol.13, №2 (48). - P.52-56.

Надійшла до редакції 01.06.2014

Рецензент – проф. Н.В.Пашковська

© О.Я. Жураківська, 2014