

УДК 616.379-008.64-092.9

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ПАНКРЕАТИЧЕСКИХ ОСТРОВКОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

Можейко Л.А., Соколов Н.К.

УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

Представительство ООО «Actavis international Limited» (Республика Мальта)

в Республике Беларусь

В настоящем исследовании гистохимическими и морфометрическими методами изучались структурно-функциональные изменения в эндокринном аппарате поджелудочной железе белых крыс и мышей с аллоксан- и стрептозотоцин- индуцированным диабетом. Анализ полученных данных показал, что развитие экспериментального сахарного диабета сопровождалось некробиотическими процессами в В-клетках, уменьшением площади эндокринных островков, тотальной дегрануляцией и компенсаторной гипертрофией части оставшихся инсулиноцитов.

Ключевые слова: поджелудочная железа, эндокринные островки, В-клетки, экспериментальный диабет, аллоксан, стрептозотоцин.

Введение

В настоящее время сахарный диабет занимает 3-е место в мире среди неинфекционных болезней. При этом с каждым годом наблюдается тенденция к росту. Согласно данным Всемирной Организации Здравоохранения каждое десятилетие количество пациентов с этим сложным заболеванием удваивается и составляет сейчас 347 миллионов человек [2]. Прогнозируется, что к 2030 году диабет займет лидирующее положение среди причин смерти в мире. Ранняя инвалидизация и летальность связаны в основном с сосудистыми осложнениями заболевания. Изучение сахарного диабета ведется по многим направлениям. Широко используются экспериментальные модели, позволяющие получить ценные сведения не только для понимания патофизиологии заболевания, но и механизма антидиабетического действия различных препаратов на этапе доклинических испытаний. Применение при этом морфологических методов исследования расширяет возможности для более достоверной оценки состояния панкреатических островков и В-клеток.

Цель работы – сравнительное изучение степени повреждения эндокринного аппарата поджелудочной железы при аллоксановом и стрептозотоциновом диабете.

Материал и методы исследования

Исследование выполнено на 36 самцах белых лабораторных крыс и мышей, взятых поровну. Из каждого вида животных формировались две экспериментальные группы по 9 особей. Первая группа была представлена интактными животными, служившими контролем. Во вторую группу входили животные с экспериментальным сахарным диабетом. Сахарный диабет у крыс моделировали однократным внутрибрюшинным введением аллоксана в дозе 130 мг/кг, а у мышей – однократным внутрибрюшинным введением стрептозотоцина в дозе 75 мг/кг, 1 раз в неделю, всего 3 дозы. В крови всех животных определяли уровень глюкозы с помощью глюкометра. В последующий эксперимент отбирались животные с уровнем сахара крови не ниже 15 ммоль/л. Они содержались в условиях вивария с естественным освещением, на стандартном рационе и питьевом режиме *ad libitum* с учетом положений, предусмотренных Европейской конвенцией о защите лабораторных животных и проекта Закона Республики Беларусь «Об обращении с животными». Крысы находились под наблюдени-

ем 26 дней, а мыши – 40 дней. По окончании эксперимента животных выводили из опыта под легким эфирным наркозом. После декапитации извлекалась поджелудочная железа. Одна часть материала замораживалась в жидком азоте, а другая фиксировалась в жидкостях Карнуа, Буэна и ацетоне. Криостатные срезы из замороженных кусочков ткани обрабатывали общепринятыми методами для определения активности ферментов, характеризующих активность метаболизма В-клеток: сукцинатдегидрогеназы (СДГ), НАДН-дегидрогеназы (НАДН-ДГ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), кислой фосфатазы (КФ). Из материала, залитого в парафин, изготавливали серийные срезы толщиной 5 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином; для выявления нуклеиновых кислот – по Эйнарсону и идентификации В-клеток островкового аппарата – по Гомори. Для количественной оценки эндокринной ткани поджелудочной железы на серийных гистологических срезах изучались следующие параметры: площадь островковой ткани и количество островков на единицу поверхности (10 мм²); средняя площадь одного островка; процентное соотношение островков с разным количеством альдегидфуксинофильной зернистости; показатели активности ферментов, которые оценивали цитометрически по оптической плотности продукта реакции в цитоплазме на максимуме поглощения, выражая результаты в условных единицах оптической плотности. Данные цитометрических и морфометрических исследований были получены при помощи системы компьютерного анализатора изображения Bioscan NT 2,0 (It Lab, Беларусь). Иллюстрационный материал готовили, используя микроскоп Axioscop 2plus (Carl Zeiss, Германия) с цифровой видеокамерой Leica DFC 320. Статистическую обработку материала осуществляли с использованием лицензионной компьютерной программы Statistica 6 для Windows (Stat. soft. Inc, USA). О достоверности межгрупповых различий судили по t-критерию Стьюдента и критериям непараметрической статистики по Манну-Уитни.

Результаты исследования

Согласно результатам исследования, как под воздействием аллоксана, так и стрептозотоцина у животных развивался экспериментальный сахарный диабет, прослеженный до 26 дней у крыс и 40 дней у мышей. Это подтверждалось их общим состоянием, появлением клинико-биохимических признаков, характер-

ных для этого заболевания (гипергликемия, глюкозурия, полифагия, полидипсия, полиурия, потеря веса) и морфофункциональными изменениями эндокринного аппарата поджелудочной железы. В целом и у крыс, и у мышей они носили однотипный характер.

С помощью морфометрических исследований установлено, что к концу опытов количество панкреатических островков на стандартной единице поверхности у опытных животных уменьшается более, чем в полтора раза по отношению к показателям интактных (табл.1). Поскольку при этом почти в 2,5 раза уменьшается средняя площадь одного островка, то еще значительно снижается площадь, занимаемая всеми островками на единицу поверхности железы. Для более точного анализа цитоархитектоники островков производилась разбивка на классы в зависимости от их размеров и количества клеток: I класс – 5-16 клеток (очень мелкие); II класс – 6-30 клеток (мелкие); III класс – 31-60 клеток (средние); IV класс – 61-100 клеток (большие); V класс – более 100 клеток (гигантские) [8]. У интактных крыс и мышей эндокринный аппарат поджелудочной железы представлен островками всех пяти классов, расположенных среди экзокринной паренхимы. В-клетки локализируются в них центрально вокруг кровеносных капилляров, а А-клетки – по периферии. Такой тип островков носит название «плащевых». У интактных крыс и мышей доминируют островки малого и среднего размера. Гигантские островки очень редки или отсутствуют. Причем у мышей количество островков на единицу поверхности и площадь, занимаемая эндокринной тканью, несколько больше, чем у крыс (табл.1).

Таблица 1 - Морфометрические показатели эндокринных островков поджелудочной железы белых крыс и мышей Ме (25;75%), р

Показатели	Группы			
	Крысы		Мыши	
	Интактные	Аллоксан	Интактные	Стрептозотцин
Количество островков на площади 10 мкм ²	12 (11; 15)	7 (6; 7) 0,007*	19 (16; 19)	11 (9; 11) 0,007*
Площадь островка, мкм ²	8100 (6750; 12600)	3600 (2250; 5850) 0,018*	8100 (6300; 9000)	3150 (900; 4500) 0,015*
Площадь островной ткани, мкм ²	119700 (93600; 149400)	36900 (28800; 60300) 0,004*	130500 (22100; 72000)	40500 (18200; 90400) 0,001*

Примечание: * - статистически значимые различия

У опытных животных доля островков I и II классов, образованных малым количеством эндокриноцитов, возрастает к 26-му дню эксперимента в среднем на 10%, а к 40-му – на 14%. В малых островках нередко наблюдается связь с расширенными выводными протоками экзокринной паренхимы поджелудочной железы и пролиферация протоковых клеток (рис.1). Уменьшение объема эндокринной ткани является результатом избирательного повреждения В-клеток островкового аппарата цитотоксическими веществами – аллоксаном и стрептозотцином, которое заканчивается их гибелью. К указанному сроку в оставшихся островках при аллоксан-индуцированном и стрептозотцин-индуцированном диабете В-клетки с признаками деструкции встречались редко. Морфологические изменения их необратимо повреждены в большинстве своем характерны

для некробиотических процессов, а не для апоптоза. Границы клеток были неотчетливы, ядра деформированы, раздуты, плохо воспринимали краску. Иногда наблюдались инсулиноциты в состоянии вакуольной дистрофии и конденсации хроматина у ядерной оболочки (рис.1). Как правило, количество секреторных гранул в В-клетках островков снижалось.

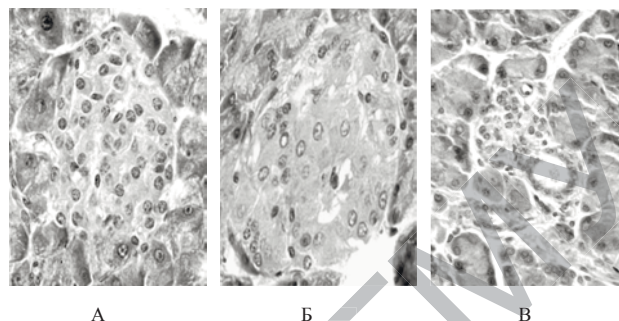


Рисунок 1 - Общий вид панкреатических островков экспериментальных крыс

А – интактное животное, неизмененный островок; Б – воздействие аллоксана, вакуолизация В-клеток; В – воздействие стрептозотцина, малый островок, связанный с выводным протоком.

Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x 400

Следует отметить, что определенная часть клеток, которые не затронуты необратимыми повреждениями, находятся в состоянии гипертрофии. Размеры этих клеток и их ядер увеличены, в то время как объёмная доля секреторных гранул уменьшается.

Поскольку считается, что секреторные гранулы, выявляемые с помощью окраски альдегидфуксином, эквивалентны депонированной форме инсулина, для морфофункциональной характеристики все островки по плотности расположения и распределению альдегидфуксинофильных гранул в В-клетках были классифицированы на четыре основных типа [1]: 1 – гипергранулированные, в которых почти все клетки равномерно заполнены гранулами; 2 – перикапиллярно-гранулированные, в клетках которых гранулы занимают апикальную часть, прилежащую к капилляру; 3 – дегранулированные с минимальным количеством гранул, группирующихся главным образом вокруг ядер В-клеток; 4 – неравномерно-гранулированные, в которых одни В-клетки заполнены гранулами, другие полностью их лишены. В поджелудочной железе интактных крыс и мышей можно наблюдать все 4 типа островков (табл. 2). При этом около половины островков состоят из инсулиноцитов, в которых преобладают процессы синтеза и накопления гранул секрета, а оставшаяся половина островков представлена инсулиноцитами с преобладанием выделения гранул. Их соотношение у интактных животных почти 1:1. Как при аллоксановом, так и при стрептозотциновом диабете обнаружено резкое возрастание островков 3-го типа, т.е. с полностью дегранулированными клетками, которые в контрольных группах встречаются редко (рис. 2). К 27-му дню развития патологического процесса после воздействия аллоксана количество таких островков достигает 70% и существенно не отличается от такового при воздействии стрептозотцина (65%). Соответственно, доля островков, содержащих В-клетки со значительным количеством альдегидфуксинофильных гранул, что

Таблица 2 - Показатели распределения островков по количеству альдегидфуксинофильной зернистости в В-клетках поджелудочной железы белых крыс и мышей при различных экспериментальных воздействиях. Ме (25; 75%), р.

Типы островков	Группы животных			
	Крысы		Мыши	
	Интактные	Аллоксан	Интактные	Стрептозоцин
1 тип - гипергранулированные	40 (40; 50)	10 (0; 10) 0,0003*	60 (50; 60)	10 (0; 20) 0,0003*
2 тип - перикапиллярно-гранулированные	40 (40; 50)	0 (0; 10) 0,0002*	20 (10; 20)	0 (0; 10) 0,1025
3 тип - дегранулированные	0 (0; 10)	70 (50; 80) 0,0002*	0 (0; 0)	65 (50; 70) 0,0002*
4 тип - неравномерно-гранулированные	10 (0; 10)	20 (20; 20) 0,0604	30 (20; 30)	20 (10; 30) 0,3074

Примечание: * - статистически значимые различия

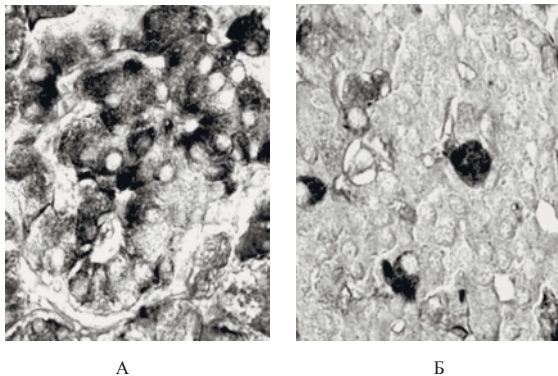


Рисунок 2. Содержание альдегидфуксинофильной зернистости в островке поджелудочной железы экспериментальных крыс

A – интактное животное; B – воздействие аллоксана. Окраска по Гомори. Увеличение $\times 400$

характерно для депонирования инсулина, падает. На 27-й день течения аллоксан-индуцированного диабета их количество снижается до 30%, а на 40-й день стрептозотоцин-индуцированного диабета до 35%.

Процессы синтеза и выделения инсулина тесно сопряжены со сдвигами метаболической активности В-клеток. При выявлении нуклеиновых кислот по Эйнарсону в них отчетливо видны те же изменения, которые наблюдались при окраске гематоксилином и эозином и описаны выше. Установлено, что у интактных животных содержание цитоплазматической РНК в В-клетках довольно умеренное. У опытных крыс и мышей в инсулиноцитах с дегенеративными изменениями отмечается закономерное снижение количества РНК. Среди оставшихся морфологически мало изменённых инсулиноцитов отмечается неравномерность гистохимической реакции, однако в большинстве дегранулированных В-клеток количество цитоплазматической РНК к 4-й неделе развития экспериментального диабета снижается и остаётся сниженным к 6-й неделе заболевания.

Аналогично изменяется и активность дегидрогеназ. Причём активность НАДН-дегидрогеназы заметно выше, чем сукцинат- и лактатдегидрогеназы как у интактных, так и у опытных животных. Следует отметить, что наибольшие показатели активности из всех изученных ферментов в В-клетках отмечаются у кислой фосфатазы, особенно для крыс. У интактных

животных продукты реакции распределялись плотно по цитоплазме и присутствовали практически во всех клетках. При введении диабетогенных агентов наблюдалась неравномерность гистохимических реакций в В-клетках островков. Снижение процессов синтеза инсулина сопровождалось параллельным падением активности дегидрогеназ, но в большей мере НАДН-ДГ. Особенно выражена неоднородность клеточной популяции инсулиноцитов при выявлении активности КФ. Наряду с клетками, в которых активность фермента снижалась до минимума, наблюдалось значительное количество инсулиноцитов с накоплением этого фермента. Но если изменения содержания РНК и дегидрогеназ подтверждаются сведениями об их участии в секреции инсулина, то в отношении роли кислой фосфатазы мнения неоднозначны. Одни считают, что существует прямая зависимость между активностью КФ и ранним образованием секреторных гранул, другие считают это очень гипотетичным [7, 10, 12]. Требуется объяснения, не является ли изменение активности КФ отражением структурных изменений самих В-клеток.

Заключение

Неизменная потребность организма в инсулине предъявляет повышенные требования к сохраняющимся элементам островкового аппарата. Почти тотальная дегрануляция большинства оставшихся островков, видимо, обусловлена освобождением инсулина из В-эндокриноцитов. Часть из них находится в состоянии повышенной функциональной активности, о чём свидетельствует гипертрофия клеток, сопровождающаяся, согласно электронно-микроскопическим данным, обилием и набуханием митохондрий, уменьшением объёма зрелых и увеличением количества незрелых гранул [4, 11]. Активация репаративных процессов в них может быть ответной реакцией на повреждающее действие цитотоксинов и рассматриваться как один из компенсаторных механизмов островкового аппарата. Второй компенсаторной возможностью в создавшихся условиях может служить образование новых островков. Поскольку пролиферативная активность самих инсулиноцитов очень низкая, наблюдающееся увеличение количества островков малого размера, по-видимому, является результатом их новообразования из протокового эпителия [5, 6]. Не исключено, что часть инсулиноцитов, особенно к 40-м суткам эксперимента, находится в состоянии перенапряжения или истощения. При этом у дегранулированных форм В-клеток выявляется вакуолизация цитоплазмы и снижение ферментативной активности. К аналогичному предположению пришли авторы, получившие у крыс на 5-6 неделе экспериментального диабета, вызванного введением стрептозотоцина, дополнительный рост гликемии на 75% и снижение флюоресценции В-клеток, связанное с уменьшением содержания инсулина [3, 5].

Сравнительный анализ морфологических и гистохимических данных разных групп экспериментальных животных показал, что аллоксан-индуцированный так же, как и стрептозотоцин-индуцированный диабет приводит к дегенеративному повреждению В-клеток, их гибели и деструкции части эндокринных островков, вследствие чего уменьшается количество островков, средняя площадь одного островка и площадь, занимаемая всеми островками на стандартной единице площади железы. Уменьшение инсулинпродуцирующих элементов снижает функциональные возможности эндокринного аппарата и вызывает

развитие абсолютной инсулиновой недостаточности. Авторы статьи выражают благодарность за-

ведущему кафедрой фармакологии профессору М.И. Бушма за организацию эксперимента.

Литература

1. Донеv, С. Степени различия бетагранулированности островков Лангерганса крысы / С. Донеv, Т. Христова, М. Зафирова // Мед. биол. пробл. 1978. № 6. – С. 31-41.
2. Информационный бюллетень ВОЗ № 312, сентябрь, 2012.
3. Колесник, Ю.М. Состояние островкового аппарата поджелудочной железы при экспериментальном сахарном диабете различной степени тяжести у крыс / Ю.М. Колесник, Г.В. Василенко, А.В. Абрамов // Архив патологии. – 1992. № 12. – С. 24-27.
4. Сравнительные аспекты ультраструктурных изменений инсулоцитов панкреатических островков при экспериментальном сахарном диабете / Г.Л. Снигур [и др.]. – Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2012. – №1. – С. 108–111.
5. Эндокринный статус и уровень экспрессии белков Vsl-2 и p53 в панкреатических островках у крыс с экспериментальным сахарным диабетом/ Т.В. Иваненко [и др.] // Патология. – 2011. – Т. 8, № 2. С. 18–20.
6. Bertalli, E. Association between endocrine pancreas and ductal system. More than an epiphenomenon of endocrine differentiation and development? / E. Bertalli, M. Bendayan // J. Histochem. & Cytochem. – 2005. – Vol. 53, №. 3. – P. 1071-1086.
7. Chatterjee, A.K. Acid phosphatase activity as an index of pancreatic beta-cell function / A.K. Chatterjee, S.K. Mukherjee // Indian J. Exp. Biol. – 1981. – V 19. – P. 228-230.
8. Heterogeneity of the langergans islets morphology in condition of hypo- and hyperglykemia / S. Donev [et al.] // Мед. прегл. Ser. Period. / Мед. универ. София. Центр. инф. мед. – 2001. – Vol. 4, № 1. – P. 3-10.
9. Induction of diabetes by streptozotocin in rats / A. Akbarzaden [et al.] // Indian Journal of Clinical Biochemistry. – 2007. – V. 22. – P. 60–64.
10. Lysosomes and pancreatic islet function time course of insulin biosynthesis, insulin secretion, and lysosomal transformation after rapid changes in glucose concentration / A.H. Landström [et al.] // Diabetes. – 1988. – V 37, № 3. – P. 309-316.
11. Papaccio G., Esposito V., Mezzogiorno V. Recovery of pancreatic B cells after Cyclosporin A treatment in bio breeding and Wistar rats // Micron and Microscopica Acta. – 1989. – Vol. 20, №. 2. – P. 89-97.
12. The use of animal models in the study of diabetes mellitus / A. Chatzigeorgiou [et. al] // In Vivo. – 2009. – V. 23. – P.245-58.

Literatura

1. Donev, S. Stepeni razlichiya betagranulirovannosti ostrovkov Langergansa kryisy / S. Donev, T. Hristova, M. Zafirova // Med. biol.probl. 1978. № 6. – S. 31-41.
2. Informatsionnyiy byulleten VOZ № 312, sentyabr, 2012.
3. Kolesnik, Yu.M. Sostoyanie ostrovkovogo apparata podzheludochnoy zhelezyi pri eksperimentalnom saharom diabete razlichnoy stepeni tyazhesti u kryis / Yu.M. Kolesnik, G.V. Vasilenko, A.V. Abramov // Arhiv patologii. – 1992. № 12. – S. 24-27.
4. Sravnitelnyie aspektyi ultrastrukturnyih izmeneniy insulotsitov pankreaticheskikh ostrovkov pri eksperimentalnom saharom diabete / G.L. Snigur [i dr.]. – Volgogradskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal. – 2012. – № 1. – S. 108–111.
5. Endokrinnyy status i uroven ekspressii belkov Vsl-2 i p53 v pankreaticheskikh ostrovkah u kryis s eksperimentalnyim saharным диабетом/ Т.В. Иваненко [i dr.] // Patologiya. – 2011. – Т. 8, № 2. С. 18–20.
6. Bertalli, E. Association between endocrine pancreas and ductal system. More than an epiphenomenon of endocrine differentiation and development? / E. Bertalli, M. Bendayan // J. Histochem.&Cytochem.—2005.—Vol.53,№.3.—P.1071-1086.
7. Chatterjee, A.K. Acid phosphatase activity as an index of pancreatic beta-cell function / A.K. Chatterjee, S.K. Mukherjee // Indian J. Exp. Biol. – 1981. – V 19. – P. 228-230.
8. Heterogeneity of the langergans islets morphology in condition of hypo- and hyperglykemia / S. Donev [et al.] // Мед. прегл. Ser. Period. / Мед. универ. София. Центр. инф. мед. – 2001. – Vol. 4, № 1. – P. 3-10.
9. Induction of diabetes by streptozotocin in rats / A. Akbarzaden [et al.] // Indian Journal of Clinical Biochemistry. – 2007. – V. 22. – P. 60–64.
10. Lysosomes and pancreatic islet function time course of insulin biosynthesis, insulin secretion, and lysosomal transformation after rapid changes in glucose concentration / A.H. Landström [et al.] // Diabetes. – 1988. – V 37, № 3. – P. 309-316.
11. Papaccio G., Esposito V., Mezzogiorno V. Recovery of pancreatic B cells after Cyclosporin A treatment in bio breeding and Wistar rats // Micron and Microscopica Acta. — 1989. — Vol. 20, №. 2. — P. 89—97.
12. The use of animal models in the study of diabetes mellitus / A. Chatzigeorgiou [et. al] // In Vivo. – 2009. – V. 23. – P.245-58.

COMPARATIVE STUDY OF THE STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHANGES OF THE PANCREATIC ISLETS IN EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS

Mozheyko L.A., Sokolov N.K.

Educational Establishment "Grodno State Medical University", Grodno, Belarus
Headquarters LLC «Actavis international Limited» (Republic of Malta) in the Republic Belarus

In the present study structural and functional changes of the endocrine apparatus have been studied by histochemical and morphometrical methods in male albino rats and mice with the alloxan- and streptozotocin- induced diabetes. The analysis of the obtained data has shown that the development of experimental diabetes mellitus was accompanied by a necrobiotic processes in B cells, decreasing the area of endocrine islets, total degranulation and compensatory hypertrophy of the part of the remaining insulin cells.

Key words: pancreas, endocrine islets, B cells, experimental diabetes, alloxan, streptozotocin.