

УДК: 616.379 - 018.1 - 091 / 092: 616.379 - 008.64 - 092.9

Т.А. Грекова

Запорожский государственный
медицинский университет

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ БЕТА- И АМИЛИНСИНТЕЗИРУЮЩИХ КЛЕТОК ПАНКРЕАТИЧЕСКИХ ОСТРОВКОВ В ДИНАМИКЕ РАЗВИТИЯ СТРЕПТОЗОТОЦИН-ИНДУЦИРОВАННОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Ключевые слова: сахарный диабет, бета-клетки, амилинсинтезирующие клетки, гипергликемия.

Резюме. Высокий уровень распространенности сахарного диабета в мире диктует необходимость всестороннего изучения сложной регуляции секреторной активности эндокриноцитов поджелудочной железы. С целью изучения морфофункционального состояния бета- и амилинсинтезирующих клеток панкреатических островков в динамике развития сахарного диабета, протекающего по типу 1, самцам крыс линии Wistar индуцировали экспериментальный сахарный диабет стрептозотоцином. Обнаруженные изменения морфофункциональных параметров панкреатических островков, а также бета- и амилинсинтезирующих клеток при экспериментальном сахарном диабете отражают включение компенсаторных механизмов, направленных на нормализацию концентрации глюкозы крови. Однако в условиях массовой деструкции бета-клеток адаптационные возможности инсулярного аппарата крайне ограничены, вследствие чего не достигается нормогликемическое состояние.

Введение

Согласно статистике ВОЗ, ежегодно количество больных сахарным диабетом (СД) увеличивается на 15 %, в Украине - на 10-11 %. По данным мировой статистики, каждые 13-15 лет количество страдающих этим недугом удваивается. Эта тенденция отмечается и в Украине. Ранняя инвалидизация и высокая смертность (третье место после сердечно-сосудистой и онкопатологии) послужила основой для определения Сент-Винсентской декларацией (1989 г.) глобальной концепции лечения и профилактики СД, основными долгосрочными целями которой были улучшение состояния здоровья лиц с СД и приближение к среднестатистическим показателям продолжительности и качества жизни, а также лечение пациентов с СД и предупреждение его осложнений путём интенсификации исследований. Всестороннее изучение эндокринного аппарата поджелудочной железы как "мини-органа" со сложной регуляцией секреторной активности эндокриноцитов показало участие панкреатического гормона амилина с широким спектром биологической активности [1] в регуляции углеводного обмена. Исходя из достаточно известных фактов о косекреции инсулина и амилина, дефицита этих гормонов при СД 1 типа и поздних стадиях СД 2 типа, сочетания

гиперинсулинемии с гиперамилинемией при СД 2 типа, становится очевидным взаимодействие этих гормонов в патогенезе нарушений углеводного гомеостаза. В настоящем исследовании мы пытались связать прогрессирующий характер течения диабета и несостоятельность компенсаторных механизмов, поддерживающих нормогликемию, с изменениями морфофункционального состояния бета- и амилинсинтезирующих клеток.

Цель исследования

Изучить морфофункциональное состояние бета- и амилинсинтезирующих клеток панкреатических островков в динамике развития стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета у экспериментальных животных.

Материалы и методы

Исследования проведены на 50 самцах крыс линии Wistar в возрасте 7-8 месяцев с массой 230-250 г, полученных из питомника Объединения ветеринарной медицины ПП "Биомодельсервис" (Институт фармакологии и токсикологии АМН Украины, г. Киев). Экспериментальная часть работы выполнена в соответствии с национальными "Общими этическими принципами экспериментов на животных" (Украина, 2001), которые согласуются с поло-

жениями "Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей" (Страсбург, 1985) с соблюдением условий, определенных Порядком проведения научными учреждениями исследований, экспериментов на животных, утвержденного приказом Министерства образования и науки, молодежи и спорта Украины от 01.03.2012 № 249, зарегистрированного в Министерстве юстиции Украины 16 марта 2012 г. № 410/20729.

Все животные были разделены на 4 группы по 10 особей в каждой: 1) животные с течением экспериментального сахарного диабета (ЭСД) 3 недели; 2) животные с течением ЭСД 5 недель; 3) с интраперитонеальным введением цитратного буфера; 4) контрольная (интактная) группа. Моделирование ЭСД проводилось в дневное время после 24-часового голодания животных. После взвешивания самцам интраперитонеально однократно вводили стрептозотин (SIGMA Chemical, США) в дозе 50 мг/кг [2], растворенный в 0,5 мл 0,1 М цитратного буфера (рН 4,5). На 7-е сутки после инъекции при установлении гипергликемии (концентрация глюкозы крови из хвостовой вены выше 8,6 ммоль/л) животных отбирали в экспериментальную группу. Длительность течения ЭСД определялась с момента введения стрептозотина. Для исключения эффекта интраперитонеального введения 10 самцам вводили 0,5 мл 0,1 М цитратного буфера (рН 4,5). При этом показатели концентрации глюкозы крови у них статистически значимо не отличались от аналогичных показателей самцов контрольной группы и не превышали 4,6-4,7 ммоль/л. В установленные сроки (3 и 5 недель) животных выводили из эксперимента после 12 часового голодания методом одномоментной декапитации под наркозом (этаминал натрия 40 мг/кг внутривенно). Извлеченную поджелудочную железу в течение 20 часов выдерживали в фиксаторе Буэна при комнатной температуре и после стандартной гистологической обработки заливали в парафин.

Серийные срезы из различных участков поджелудочной железы толщиной 5 мкм готовили на ротационном микротоме MICROM HR-360 (Microm, Германия). Для идентификации бета- и амилинсинтезирующих клеток изучались серийные срезы поджелудочной железы с использованием наборов для иммунофлюоресцентного выявления инсулина и амилина в тканях производства фирмы Peninsula Laboratories Inc. (США). Идентификацию панкреатических островков осуществляли с использованием ком-

пьютерной системы цифрового анализа изображения VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Германия) в ультрафиолетовом спектре под микроскопом Axioskop с флюоресцентной приставкой (Zeiss, Германия). Получаемое изображение вводилось посредством 8-битной CCD-видеокамеры COHU-4922 (COHU Inc., США) в компьютерную систему цифрового анализа изображения VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Германия). В автоматическом режиме определялась интенсивность иммунофлюоресценции с помощью пакета прикладных программ VIDAS-2.5 (Kontron Elektronik, Германия). Вычислялись показатели, характеризующие концентрацию гормонов и их содержание в островке. Для каждого идентифицированного панкреатического островка изучались морфометрические параметры, определяемые в автоматическом режиме: площадь панкреатического островка (мкм²); площадь иммунореактивного материала в островке (мкм²); показатели площади и количества бета- и амилинсинтезирующих клеток в площади среза панкреатического островка, рассчитываемые в интерактивном режиме. Гликемия контролировалась глюкометром "SUPER GLUCOCARD-II" (Arkray Factory, Япония), определяющим концентрацию глюкозы крови глюкозооксидазным методом. Полученные цифровые данные обрабатывали на IBM-совместимых персональных компьютерах пакетом прикладных и статистических программ VIDAS-2.5 (Kontron Elektronik, Германия) и EXCEL (Microsoft Corp., США). Для всех показателей рассчитывалось значение средней арифметической выборки (M), ее дисперсии и ошибки средней (m). Статистически значимые отличия результатов серийных исследований, для которых $p < 0,05$, были установлены методом ANOVA [3].

Обсуждение результатов исследования

У крыс с ЭСД гипергликемия к окончанию 3-й недели достигала $11,36 \pm 0,29$ ммоль/л, а в конце 5-й недели - $15,76 \pm 0,51$ ммоль/л. Концентрация глюкозы крови контрольных групп животных находилась в эугликемическом диапазоне.

Для детальной характеристики морфофункционального состояния [2] все обнаруженные островки поджелудочной железы математическим классификационным анализом были разделены на типы по площади: 1) малые островки, площадью 100-1500 мкм²; 2) средние - 1500-3500 мкм²; 3) большие - 3500-7500 мкм²; 4) гигантские - более 7500 мкм². У животных с 3-недельным ЭСД преобладали маленькие островки при низком процентном содержании

островков других типов. Такая тенденция сохранялась и на 5-й неделе ЭСД, вплоть до полного исчезновения гигантских островков. Это согласуется с выдвинутыми ранее предположениями о слабой базальной и глюкозо-стимулированной секреции инсулина большими островками [4, 5] и устойчивостью к ишемии маленьких островков благодаря особенностям их кровоснабжения [5].

В течение 3-х недель ЭСД у животных происходила редукция площади островков на 21% ($p < 0,05$) по сравнению с контрольными, а к окончанию 5-й недели ЭСД - еще на 33% ($p < 0,05$), сравнительно с животными с 3-х недельным ЭСД, что в целом в сравнении с контролем составило уменьшение 47% ($p < 0,05$). Полученные нами данные согласуются с результатами многочисленных исследований о прогрессирующем снижении площади островков при сахарном диабете 1 типа. Кроме того, некоторые авторы указывают на прямую зависимость между степенью уменьшения площади островков и тяжестью течения диабета [6]. Согласно нашим данным уменьшение площади островков к концу 3-й недели ЭСД было обусловлено снижением количества в них бета-клеток на 43% ($p < 0,05$), несмотря на 33% ($p < 0,05$) рост показателя их средней площади в сравнении с животными контрольной группы. Площадь островков уменьшалась и к концу 5-й недели ЭСД за счет снижения количества бета-клеток на 60% ($p < 0,05$), площадь которых была на 17% больше ($p < 0,05$), чем у животных контрольной группы.

Концентрация инсулина в бета-клетках у интактных и опытных животных статистически значимо не изменялась, но его содержание в островках значительно снижалось на 64% и 70% ($p < 0,05$) по истечении 3-й и 5-й недели течения ЭСД, сравнительно с этим показателем в контроле. По данным ряда исследователей такое снижение связано с высокой активностью секреции инсулина при гипергликемии. Но постоянно высокая потребность в инсулине не компенсируется его биосинтезом при деструкции бета-клеток [6].

Среднее количество амилинсинтезирующих клеток в островках животных с 3- и 5-недельным ЭСД было значительно ниже (на 62% и 69% ($p < 0,05$) соответственно) сравнительно с контролем. Средняя их площадь к концу 3-й недели ЭСД на 11% ($p < 0,05$) снижалась и к окончанию 5-й недели уже статистически значимо не изменялась. Содержание амилина в синтезирующих его клетках не претерпевало статистически значимых изменений к окончанию 3-й недели ЭСД, а по истечении 5-й недели ЭСД значение этого показателя возрастало на 36% ($p < 0,05$)

сравнительно с животными с 3-х недельным ЭСД и контрольными. Но среднее содержание амилина в островках по сравнению с контролем статистически значимо не изменялось ни к окончанию 3-й, ни к окончанию 5-й недели ЭСД. То есть, определялось увеличение содержания амилина в синтезирующих его клетках при неизменном его содержании в островках животных по мере прогрессирования ЭСД.

Выводы

1. Развитие ЭСД у крыс сопровождается изменением морфофункциональных параметров панкреатических островков, а также бета- и амилинсинтезирующих клеток.

2. Морфофункциональное состояние бета- и амилинсинтезирующих клеток при ЭСД отражает включение компенсаторных механизмов, направленных на нормализацию концентрации глюкозы крови, о чем свидетельствует преобладание маленьких островков, высокая активность секреции инсулина, увеличение содержания амина в синтезирующих его клетках.

3. В условиях массовой деструкции бета-клеток при ЭСД адаптационные возможности инсулярного аппарата крайне ограничены, вследствие чего не достигается нормогликемическое состояние.

Перспективы дальнейших исследований

Установленные нами особенности изменений морфофункционального состояния амилинсинтезирующих эндокриноцитов требуют дальнейшего изучения для понимания их роли в регуляции углеводного обмена в норме, а также при артериальной гипертензии, ожирении и другой патологии.

Литература. 1. Pillay K. Amylin uncovered: a review on the polypeptide responsible for type II diabetes / Pillay K., Govender P. - *Biomed. Res. Int.* - 2014. - 223(1). - Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3626316>. 2. Саногенное влияние многодневных гипоксических тренировок на эндокринную функцию панкреатических островков крыс с экспериментальным сахарным диабетом / Ю. М. Колесник [и др.] // *Физиол. журн.* - 2012. - Том 58, № 4. - С. 67. 3. Статистика / Андреева Е. А., Вилло Н. Ю., Зайцева О. А. и др. - СПбГИЭУ (ИНЖЭКОН), 2011 - 276 с. 4. Small islets transplantation superiority to large ones: implications from islet microcirculation and revascularization / Li W [et. al.] // *J. Diabetes Res.* - 2014. Apr. 16. - Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4009214>. 5. Small human islets comprised of more β -cells with higher insulin content than large islets / Farhat B. [et. al.] // *Islets.* - 2013. Mar-Apr. 5(2). - P. 87-94. - Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2364889>. 6. Protective effects of a nicotinamide derivative, isonicotinamide, against streptozotocin-induced β -cell damage and diabetes in mice / Makiko Fukaya [et. al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2013. Dec. - 442(0). - P. 92 - 98. - Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24246675>

**МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН БЕТА- ТА
АМІЛІНСИНТЕЗУЮЧИХ КЛІТИН
ПАНКРЕАТИЧНИХ ОСТРІВЦІВ В ДИНАМІЦІ
РОЗВИТКУ СТРЕПТОЗОТОЦИН-ІНДУКОВАНОГО
ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ У ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ
ТВАРИН**

Т. А. Грекова

Резюме. Високий рівень поширеності цукрового діабету у всьому світі диктує необхідність всебічного вивчення складної регуляції секреторної активності ендокриноцитів підшлункової залози. Із метою вивчення морфофункціонального стану бета- і амілінсинтезуючих клітин панкреатичних острівців у динаміці розвитку цукрового діабету, що перебігає по типу 1, самцям щурів лінії Wistar було індуковано експериментальний цукровий діабет стрептозоточином. Виявлені зміни морфофункціональних параметрів панкреатичних острівців, а також бета- і амілінсинтезуючих клітин при експериментальному цукровому діабеті відображають включення компенсаторних механізмів, спрямованих на нормалізацію концентрації глюкози крові. Однак в умовах масової деструкції бета-клітин адаптаційні можливості інсулярного апарату вкрай обмежені, внаслідок чого не досягається нормоглікемічний стан.

Ключові слова: цукровий діабет, бета-клітини, клітини, що синтезують амілін, гіперглікемія.

**MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL STATE OF
PANCREATIC ISLETS' BETA AND AMYLIN
SYNTHETIC CELLS IN THE STREPTOZOTOCIN-
INDUCED DIABETES DYNAMICS IN EXPERIMENTAL
ANIMALS**

T.A. Hrekova

Abstract. To study morphological and functional state of pancreatic islets' beta - and amylin synthesize cells in the dynamics of Type 1 diabetes development, male Wistar rats were induced experimental diabetes (EDM) by streptozotocin. Serial sections from different parts of the pancreas thickness of 5 microns were prepared on a microtome MICROM HR-360 (Microm, Germany). To identify beta- and amylin synthesize cells immunofluorescence detection kits of insulin and amylin (produced by Peninsula Laboratories Inc., USA) were used. Identification of pancreatic islets was performed using a computer analysis of a digital image VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Germany) in the ultraviolet spectrum under Axioskop microscope with fluorescence attachment (Zeiss, Germany). The resulting image was input by 8-bit CCD-camera COHU-4922 (COHU Inc., USA) in a computer system, digital image analysis VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Germany). For each pancreatic islet morphometric parameters (pancreatic islet area, mcm²; area of immunoreactive material in the island, mcm²; area and the number of beta - and amylin synthesize cells in islet) and parameters characterizing the concentration of hormones and their content in the island were studied. Glycemia was measured by "SUPER GLUCOCARD-II" (Arkray Factory,

Japan). Statistically significant differences between the results of studies with $p < 0,05$ were established by ANOVA. In rats with EDM hyperglycemia reached $11,36 \pm 0,29$ mmol/l to the end of the 3rd week, and at the end of the 5th week - $15,76 \pm 0,51$ mmol/l. The control group animals' blood glucose concentration was in the normal range. All found islets by mathematical classification analysis were divided into types by area: 1) small islands - 100-1500 mcm²; 2) medium - 1500-3500 mcm²; 3) large - 3500-7500 mcm²; 4) huge - more than 7500 mcm². In animals with a 3-week EDM dominated small islands with low percentages of other types. This trend continued on the 5th week of the EDM. Within 3 weeks occurred islet area reduction of 21% ($p < 0,05$) in EDM animals compared with the control, and the end of the EDM 5th week - of 33% ($p < 0,05$), relatively with a 3-week EDM, which was 47% ($p < 0,05$) decreasing in comparison with the control. According to our data, area islands' reduction up to the end of the 3rd week of EDM was due to decreasing of the beta cells number by 43% ($p < 0,05$), although 33% ($p < 0,05$) growth of their area, in comparison with control animals. Islets' area decreased up to the end of the 5th week of EDM by the 60% ($p < 0,05$) reducing the beta cells' number, but their area was 17% higher ($p < 0,05$) than in control. The concentration of insulin in the beta cells of intact and experimental animals were not significantly changed, but its content in the islets was significantly reduced by 64% and 70% ($p < 0,05$) after 3 and 5 weeks of EDM, relatively of those in the control. The amylin synthesize cells number in islets of animals with 3- and 5-week EDM was significantly lower at 62% and 69% ($p < 0,05$), respectively, compared with the control. Their average area decreased up to the end of the 3rd week of EDM by 11% ($p < 0,05$) and by the end of the 5th week has not significantly changed. The content of amylin in amylin synthesize cells did not undergo significant change up to the end of the 3rd week of EDM, and after the 5th week of EDM this parameter increased by 36% ($p < 0,05$) compared with 3-week EDM and control animals. Amylin content in the islets were not significantly altered either at the end of EDM 3rd or 5th week, compared with the control. Conclusions: The development of EDM in rats is accompanied by morphological and functional parameters changes of pancreatic, beta- and amylin synthesize cells. The morphological and functional state of beta- and amylin synthesize cells in EDM reflects the inclusion of compensatory mechanisms aimed to normalize blood glucose level: the predominance of small islands, the high activity of insulin secretion, increasing the amylin content in the cells synthesizing it. In terms of massive destruction of beta cells in the EDM the insular apparatus adaptive capacity is extremely limited, so that normoglycemic state can not be achieved.

Key words: diabetes, beta-cells, amylin synthetic cells, hyperglycemia.

Zaporozhye State Medical University

Clin. and experim. pathol. - 2015. - Vol.14, №2 (52). - P.77-80.

Надійшла до редакції 28.05.2015

Рецензент – проф. С.С. Ткачук

© Т.А. Грекова, 2015