

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 мм<sup>2</sup>); средняя площадь одного островка; процентное соотношение островков с разным количеством альдегидфуксинофильной зернистости; показатели активности ферментов, которые оценивали цитофотометрически по оптической плотности продукта реакции в цитоплазме на максимуме поглощения, выражая результаты в условных единицах оптической плотности. Данные цитофотометрических 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, расположенными 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).

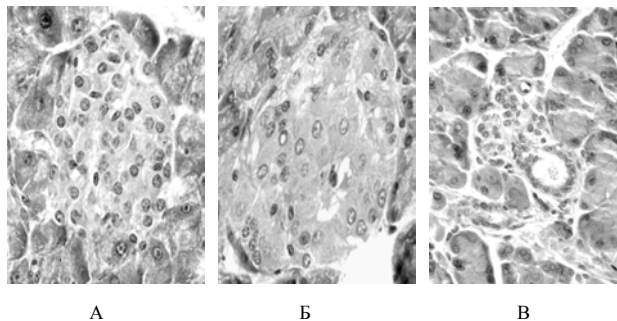
**Таблица 1** - Морфометрические показатели эндокринных островков поджелудочной железы белых крыс и мышей Ме (25;75%), р

Показатели	Группы			
	Крысы		Мыши	
	Интактные	Аллоксан	Интактные	Стрептозотцин
Количество островков на площади 10 мкм <sup>2</sup>	12 (11; 15)	7 (6; 7) 0,007*	19 (16; 19)	11 (9; 11) 0,007*
Площадь островка, мкм <sup>2</sup>	8100 (6750; 12600)	3600 (2250; 5850) 0,018*	8100 (6300; 9000)	3150 (900; 4500) 0,015*
Площадь островной ткани, мкм <sup>2</sup>	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 повреждения 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, неизменный островок; Б – воздействие аллоксана, вакуолизация В-клеток; В – воздействие стрептозотцина, малый островок, связанный с выводным протоком. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x 400*

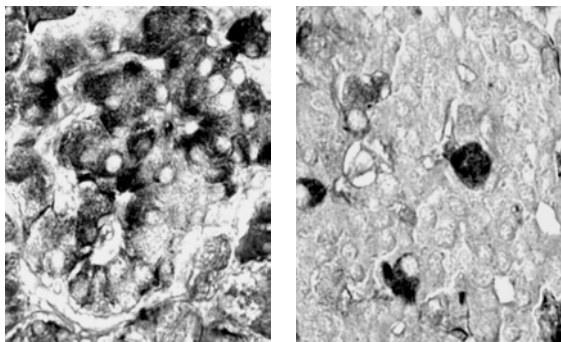
Следует отметить, что определенная часть клеток, которые не затронуты необратимыми повреждениями, находятся в состоянии гипертрофии. Размеры этих клеток и их ядер увеличены, в то время как объёмная доля секреторных гранул уменьшена.

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



А

Б

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

А – интактное животное; Б – 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 флуоресценции 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 Vcl-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. Diol. – 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 diabedom / T.V. Ivanenko [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. Diol. – 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.*