

© Балуш Л.В., Яценко А.М., Ковалишин В.І.

УДК 611.37:616-076:616.379-008.64-092.4/9

ГІСТОХІМІЧНІ ТА ЕЛЕКТРОННОМІКРОСКОПІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ НА ТЛІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ

Л.В.Балуш, А.М.Яценко, В.І.Ковалишин

Кафедра гістології, цитології та ембріології (зав. – проф. О.Д.Луцик) Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького

Резюме. Показано, що при експериментальному цукровому діабеті у підшлунковій залозі щурів зменшується кількість В-інсулоцитів з альдегід-фуксифільним компонентом, відбувається модифікація інтенсивності ШИК-позитивного матеріалу. Електронномікроскопічно встановлені деструктивні зміни морфології В- і А-інсулоцитів, клітинних елементів ацинусів і компонентів гемокапілярів мікроциркуляторного русла ендокринної та екзокринної частин підшлункової залози.

Ключові слова: підшлункова залоза, стрептозотозин, гістохімія, електронна мікроскопія.

Інсулінозалежний цукровий діабет (ЦД) 1-го типу визначають як хронічне автоімунне захворювання, при якому відбувається селективна прогресуюча деструкція В-клітин у панкреатичних острівцях [1, 2]. Внаслідок цього виникає гіпоінсулінізм з подальшим порушенням гомеостазу глюкози, що призводить до появи клінічних симптомів, характерних для цукрового діабету 1-го типу [3, 4]. Підшлункова залоза (ПЗ) – майже єдиний орган, який завдяки поєднанню зовнішньосекреторної та ендокринної функцій бере участь практично в усіх фізіологічних процесах [5]. Через анатомічні особливості та складність регуляції функцій діагностика різноманітних патологічних станів ПЗ надзвичайно складна [6, 7].

Мета дослідження. Вивчити морфофункціональні особливості екзокринної та ендокринної частин ПЗ щурів у нормі та при стрептозотозин-індукованому ЦД.

Матеріал і методи. Дослідження проведено на 55 щурах-самцях лінії Вістар масою 110-120 г, яких утримували в стандартних умовах віварію. Тварини поділені на дві групи: контрольна – 10 щурів, дослід-

на – 45. Експериментальний ЦД викликали внутрішньоочеревинним введенням стрептозотозину фірми "Sigma" (США) з розрахунку 7 мг на 100 г маси тіла. Розвиток ЦД контролювали за рівнем глюкози, яку визначали глюкооксидазним методом з використанням реактивів фірми "LaChema" (Чехія) відповідно до інструкцій виробника. Утримання тварин та маніпуляції проводили відповідно до положень "Загальних етичних принципів експериментів на тваринах", ухвалених I Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Через 14 днів після введення стрептозотозину тварин, у яких рівень глюкози в крові був у межах 10-18 ммоль/л, забивали шляхом декапітації після передозування ефірного наркозу. Шматочки ПЗ фіксували у 4 % розчині нейтрального формаліну з наступним заливанням у парафін за стандартною методикою. Для отримання оглядових препаратів зрізи завтовшки 5-7 мкм фарбували гематоксиліном і еозинном. Для виявлення глікогену використовували ШИК реакцію (Э.Пирс, 1962; Х.Луна, 1980). Для виявлення В-інсулоцитів ПЗ фарбували аль-

дегід-фуксином за методом Гоморі в модифікації Фаліна (Е.Б.Долатказина, 1984). Препарати вивчали за допомогою мікроскопа Carl Zeiss Jena Ng, для фотографування користувалися цифровою фотокамерою Canon IXUS 700 та фотосистемою Olutrus на базі мікроскопа VX-41. Для електронної мікроскопії матеріал фіксували у 0,5 % глутаровому альдегіді з подальшою обробкою матеріалу для електронно-мікроскопічного дослідження. Перегляд та фотографування препаратів здійснювали на мікроскопі УЕМВ-100К.

Результати дослідження та їх обговорення. При забарвленні гістологічних препаратів гематоксиліном і еозином констатували, що ПЗ щурів контрольної групи складається з екзокринної частини, представленої ацинусами, системою вивідних проток та ендокринної частини, представленої острівцями Лангерганса. В острівцях виявляються клітини з периваскулярною локалізацією та наявністю в цитоплазмі альдегід-фуксифільного ШИК-позитивного матеріалу як в екзокринній частині, більшою чи меншою мірою в надядерній зоні панкреатоцитів, так і в цитоплазмі і ядрах інсулоцитів та в просвітах гемокапілярів. При стрептозотоцин-індукованому ЦД констатовані деструктивні зміни як в екзокринній, так і в ендокринній частинах ПЗ, зменшення кількості острівців, зміна та втрата чіткості їх контурів та форми, зменшення в них кількості клітин з альдегід-фуксифільним компонентом. В екзокринній частині виявлені ділянки некрозів та збільшення лімфатичних вузликів навколо ПЗ у сполучнотканинній капсулі, що свідчить про зміни імунних процесів при дії стрептозотоцину.

Тропність стрептозотоцину В-клітин зумовлена наявністю в його складі молекули глюкози, за допомогою якої він селективно зв'язується з переносником глюкози GLUT-2 і сприяє її проникненню в цитоплазму [8]. Основним метаболізмом стрептозотоцину, з яким найбільше пов'язаний

його токсичний ефект, є оксид азоту. Доведено (J.Turk et al., 1993), що завдяки наявності нітрозного залишка стрептозотоцин здатний неферментативно вивільнювати вільний NO. За таких умов у В-інсулоцитах, де накопичується велика кількість стрептозотоцину, виникає висока концентрація оксиду азоту, який може перетворюватися в пероксинітрит і призводить до процесів вільно радикального окиснення. Специфічна дія NO на В-клітини полягає також в активації гуанілатциклази, що призводить до підвищення рівня cGMP, інгібування мітохондріальної аконітази та порушень аеробного окиснення глюкози, а отже, пригнічення глюкозостимульованої секреції та синтезу інсуліну (R.B.Stevens et al., 1997). У спеціальних дослідженнях [9] показано, що вже через 12 год після уведення стрептозотоцину спостерігається первинна гіперглікемічна реакція, яка виникає внаслідок загибелі значної кількості В-клітин у панкреатичних острівцях. Пік гіперглікемії відбувається на 2-3 доби. Такий механізм загибелі В-інсулоцитів підтверджує одержані нами дані про зменшення кількості клітин з альдегід-фуксифільним компонентом.

Кількість ШИК-позитивного матеріалу також зменшується в інсулоцитах острівців та в їх ядрах (рис. 1). Протилежні результати стосовно глікогену отримано в дослідженні П.Лэйсли (1964) [цит. за Е.Б.Долатказина, 1984], де виявлено, що глікоген в острівкових клітинах у нормі не виявлявся. При алоксановому ЦД він виявляється у цитоплазмі В-інсулоцитів та в епітелії проток. Суперечливі результати щодо цитотопографії глікогену можна трактувати дією препарату, яким викликали ЦД у тварин.

В результаті електронномікроскопічного дослідження ультратонких зрізів ПЗ інтактних щурів підтверджено основні закономірності будови органа на світлооптичному рівні. Основний об'єм органа охоплює екзокринна частина, яка представлена ацинусами і системою вивідних проток. Вивід-

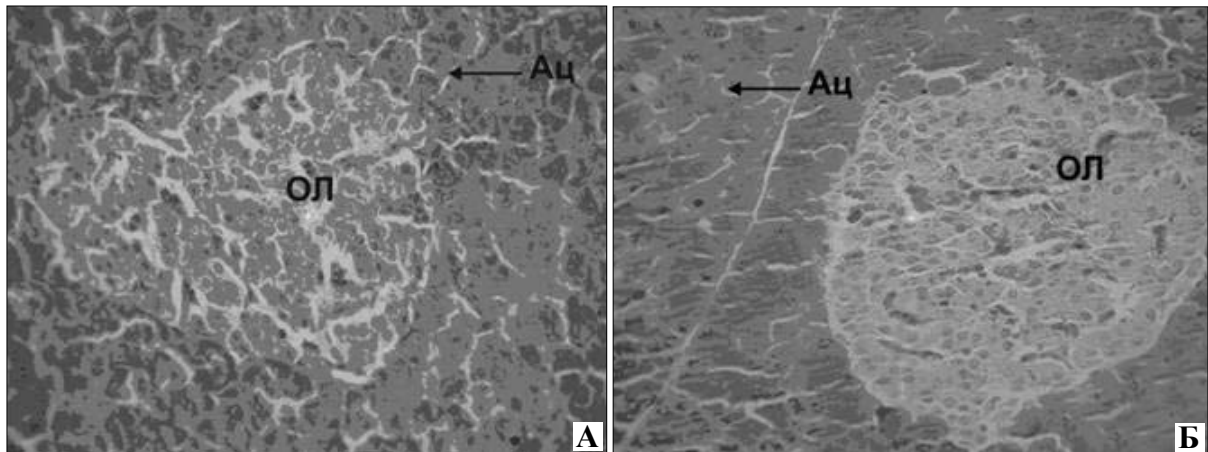


Рис. 1. Включення глікогену у структурних компонентах підшлункової залози щурів: А – ШИК-позитивна реакція у структурних компонентах підшлункової залози контрольної групи (ОЛ – острівцеві Лангерганса; Ац – ациноси); Б – зниження інтенсивності ШИК-реакції при експериментальному цукровому діабеті. Об. 40 \times .

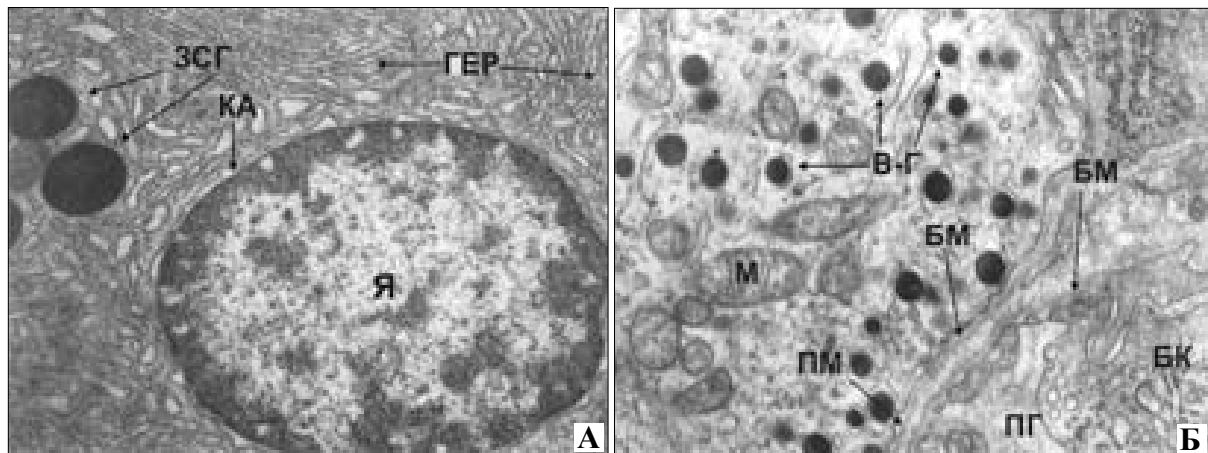


Рис. 2. Електронномікроскопічна організація структурних компонентів підшлункової залози. А - фрагмент панкреатоцита: ядро, гранулярний ендоплазматичний ретикулум, комплекс Гольджі, гранули зимогену. Зб. 8000 \times . Б - фрагмент цитоплазми В-інсулоцита панкреатичного острівця і гемокапіляра. Зб. 20000 \times .

ні протоки і групи ацинусів оточені прошарками пухкої сполучної тканини з компонентами мікроциркуляторного русла (МЦР) та характерними для даного виду тканини клітинними елементами і волокнистими структурами. Стінка гемокапілярів МЦР утворена базальною мембраною та ендотеліальними клітинами, до базальної мембрани ззовні подекуди примикають перицити. Для ендотеліальних клітин характерна середня електронна щільність цитоплазми. Ядра таких клітин заповнені еухроматином, всередині якого міститься ядерце. Зовні ядра ендотеліальних клітин оточені нуклеоломою,

в якій чітко вирізняється зовнішня і внутрішня мембрани та перинуклеарний простір. Від зовнішньої ядерної мембрани відходять канали, що переходять у гранулярний ендоплазматичний ретикулум. Ділянки цитоплазми ендотеліоцитів розташовані біля ядра, насичені рибосомами та полісомами. Окрім того, в цитоплазмі останніх є незначна кількість мітохондрій. У стінці гемокапілярів ендотеліоцити з'єднані між собою за допомогою щільних та щілинних контактів. Просвіти гемокапілярів заповнені дрібнозернистою плазмою крові і поодинокими еритроцитами. Панкреатичні аци-

нуса утворені клітинами конічної форми, що лежать на базальній мембрані, в яких розрізняють базальну і апікальну поверхню. У базальній частині панкреатоцитів визначається гранулярний ендоплазматичний ретикулум зі значною кількістю рибосом та ядра великих розмірів (рис. 2), у цитоплазмі є полісоми та мітохондрії. У надядерній зоні більшості панкреатоцитів ацинуса присутня велика кількість електроннощільних секреторних гранул зимогену. В окремих ацинусах над апікальною поверхнею панкреатоцитів розташовуються клітини овальної форми з електронно світлою цитоплазмою (центроацинозні клітини). Міжацинозні протоки утворені клітинами кубічної або призматичної форми залежно від їх локалізації. На апікальній поверхні останніх є поодинокі мікроборсинки, ядро як правило розташоване в базальній частині, у надядерній зоні цитоплазма середньої електронної щільності з невеликою кількістю органел.

Ендокринна частина утворена декількома типами клітин, серед яких переважають клітини низької електронної щільності, очевидно А- і В-інсулоцити. Ці клітини в основному локалізуються у периферійних ділянках острівців, до яких примикають гемокапіляри. В-інсулоцити полігональної форми, в їх цитоплазмі є досить велика кількість секреторних гранул, вміст яких

відокремлений від їх мембрани широкою світлою облямівкою. А-інсулоцити більші від В-інсулоцитів, ядра їх бідні на гетерохроматин, у цитоплазмі є гранули, щільний вміст яких відокремлений від мембрани вузькою світлою облямівкою. Окрім того, у складі острівців є зірчастої форми клітини із секреторними гранулами великих розмірів та клітини полігональної форми з дрібненькими гранулами.

У тварин дослідної групи клітинні елементи ендокринної частини ПЗ зазнають деструктивних змін. У В-інсулоцитах електроннощільний вміст гранул відокремлений електронно світлою облямівкою, оточеною мембраною з нечіткими контурами. Інколи такі мембрани розпушені або зовсім не виявляються, біля гранул без мембран містяться значних розмірів автофаголізосоми, поодинокі гіпертрофовані мітохондрії та розширені цистерни комплексу Гольджі. Гіалоплазма в ділянці локалізації гранул електронно світла, частково візована. Окрім того, спостерігається дезорганізація мембран гранулярного ендоплазматичного ретикулуму. Плазмолема В-інсулоцитів на окремих ділянках розпушена, для більшості мітохондрій, віддалених від секреторних гранул, характерна підвищена електронна щільність, дезорганізація крист та матриксу. Окремі В-інсулоцити з перикапілярною лока-

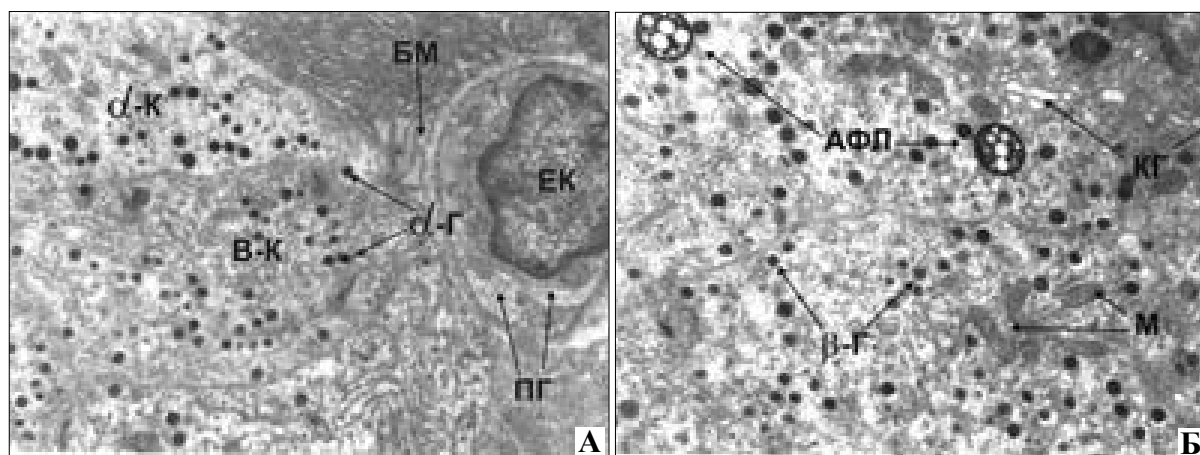


Рис. 3. Ультраструктура клітин панкреатичного острівця та гемокапіляра на тлі стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету. А – дезорганізовані А- і В-клітини з частково прилеглим просвітом гемокапіляра; Б – В-інсулоцити з гіпертрофованим комплексом Гольджі і дезорганізованими секреторними гранулами. Зб. 4000 \times .

лізацією цілком позбавлені секреторних гранул. Базальна мембрана гемокапілярів у ділянці островців потовщена, з нерівними контурами. Для ендотеліоцитів характерна наявність фенестрів, у цитоплазмі останніх присутні малих розмірів електроннощільні конгломерати у формі депозитів (рис. 3). Цитоплазма ендотеліоцитів підвищеної електронної щільності, поодинокі мікроросинки їх люменальної поверхні глибоко занурені у плазму крові. Мітохондрії ендотеліоцитів дезорганізовані, мікроміхурці з нечіткими лімітуючими мембранами. Для нуклеолеми ядер характерні зміни структури профілів внутрішньої і зовнішньої мембран. У просвітах гемокапілярів у значних кількостях присутні електроннощільні лапаті маси. Для А-інсулоцитів також характерна нестабільність їх фізіологічних параметрів. Ядра А-інсулоцитів, в основному, заповнені гетерохроматином. У певних ділянках цитоплазми таких клітин мембранні органели та гіалоплазма дезорганізовані. Для мітохондрій характерна деструкція крист і внутрішньої мембрани, вакуалізація їх матриксу.

Згідно з дослідженнями О.О.Фільченко, Р.С.Стойки [10], однією з найбільш ранніх апоптичних подій, в яких задіяні мітохондрії, вважається зниження рівня електродіагностичного потенціалу мітохондріальної мембрани та підвищення рівня продукції активних сполук кисню, що ведуть до пошкодження клітинних білків та нуклеїнових кислот. Зниження рівня мембранного потенціалу відбувається ще до розщеплення ДНК на олігонуклеосомні фрагменти. Як наслідок порушується процесинг мітохондріальних білків, що синтезуються в цитоплазмі, а також відбувається зупинка внутрішньомітохондріальної трансляції та розмежування процесів окисного фосфорилювання [11]. Різке зниження рівня мембранного потенціалу мітохондрій можна вважати універсальною ранньою подією, характерною для апоптозу. Деструкція крист і

внутрішньої мембрани мітохондрій у нашому дослідженні може бути одним із механізмів запуску апоптозу. Окрім того, спостерігалися зміни організації мембранних компонентів ендоплазматичного ретикулуму. А-інсулоцити з периваскулярною локалізацією зазнавали найбільш виражених змін, особливо, це стосувалося плазмолем, яка була на певних ділянках розпушеною або цілком відсутньою. Тут виявлялися преципітати та коагуляти, що зливалися з дезорганізованими масами основної речовини сполучної тканини, базальної мембрани гемокапілярів та електроннощільними перфорованими частинами ендотелію. У просвітах гемокапілярів помітна адгезія еритроцитів з люменальною поверхнею ендотеліоцитів.

В екзокринній частині ПЗ спостерігаються морфологічні зміни в компонентах МЦР, міжклітинній речовині і панкреатоцитах. Основна речовина сполучної тканини і колагенові волокна місцями дезорганізовані. У гемокапілярах МЦР базальна мембрана потовщена, ядра ендотеліоцитів великих розмірів, витягнутої форми, із звивистим контуром та численними куполоподібними випинами. Гетерохроматин підвищеної електронної щільності, ядерце гіпертрофоване. Люменальна поверхня ендотеліоцитів утворює велику кількість мікроросинок та кавеол, у периферійній частині цитоплазми поодинокі піноцитозні міхурці. Часто спостерігалися деструктивні зміни контактів між ендотеліоцитами, просвіт МЦР заповнений лапатими масами плазми крові, пучками волокон мономера фібрину. Цитоплазма ациноцитів низької електронної щільності, в окремих з них по два великих ядра еліпсоподібної форми з гомогенно розташованим хроматином та гіпертрофованим ядерцем. У базальній та центральній частинах панкреатоцитів спостерігається розширення цистерн і каналів ендоплазматичного ретикулуму та збіднення їх на рибосоми, що вказує на зниження синтетичних

процесів. Мітохондрії таких клітин втрачали чіткість контурів крист зовнішньої і внутрішньої мембран. У надядерній частині виявляється гіпертрофія компонентів комплексу Гольджі, автофаголізосоми зі значним вмістом ліпопротеїнових включень, локальне скупчення зимогенних гранул, окремі гранули контактували з плазмолемою панкреатоцитів, тобто були у стані екструзії. На апікальній поверхні панкреатоцитів велика кількість мікрворсинок. Спостерігаються деструктивні зміни морфології міжклітинних контактів між панкреатоцитами. Для центроацинозних клітин характерна наявність вакуолей, що є ознакою їх дегенерації. Зміни деструктивного характеру мембранних органел вказують на зниження синтетичних процесів у клітинних елементах ацинусів. Такі процеси, ймовірно, зумовлені негативним впливом стрептозотозину. При хронічній свинцевій інтоксикації організму Н.К.Каширина, О.В.Степанова [12] виявили подібні зміни морфології МЦР та екзокринної частини ПЗ. Проведені нами дослідження показали негативний вплив стре-

птозотозину на структурні компоненти гемокапілярів МЦР та екзокринну частину ПЗ поряд з блокуванням синтезу інсуліну, що супроводжувалося зміною морфології гранул, В-інсулоцитів або їх відсутністю та деструктивними змінами компартментів В- і А-інсулоцитів.

Висновки. 1. При стрептозотозиново-му цукровому діабеті у підшлунковій залозі щурів відбувається зменшення кількості В-інсулоцитів з альдегід-фуксифільним компонентом та модифікація цитотопографії ШИК-позитивного матеріалу. 2. На основі електронномікроскопічних досліджень встановлено деструктивні зміни морфології В- і А-інсулоцитів, клітинних елементів ацинусів та структурних компонентів гемокапілярів мікроциркуляторного русла ендокринної та екзокринної частин підшлункової залози.

Перспективи подальших досліджень. Доцільно вивчити морфофункціональні особливості підшлункової залози при інсулінзалежному цукровому діабеті на аутопсійному матеріалі.

Література

1. Попова В.В. Открытие аутоантител к островкам Лангерганса поджелудочной железы – выдающееся достижение в области предсказания возникновения и диагностики типа сахарного диабета в клинике (обзор литературы и собственные данные) / В.В.Попова, К.П.Зак // Врач. дело. – 2006. – № 7. – С. 3-12.
2. Devendra D. Type 1 diabetes: recent development / D.Devendra, E.Liu, G.Eisenbarth // BMJ. – 2004. – Vol. 328, № 7442. – P. 750-754.
3. Балаболкин М.В. Диабетология / М.В.Балаболкин. – М.: Медицина, 2000. – 672 с.
4. Iwahasi H. Molecular mechanism of pancreas beta – cell destruction in autoimmune diabetes: potential targets for preventive therapy / H.Iwahasi, N.Itoh // Cytokines, cellulose et molecular therapy. – 1998. – Vol. 4. – P. 45-51.
5. Кот Л. Сучасні уявлення про біохімічні механізми патогенезу інсуліннезалежного цукрового діабету / Л.Кот, О.Богданова, Л.Остапенко // Вісн. НАН України. – 2008. – № 9. – С. 18-26.
6. Комаренко Д.Ш. Пострадіаційна панкреатологія: віддалені наслідки іонізуючого опромінення / Д.Ш.Комаренко, О.Б.Поляков // Суч. гастроентерол. – 2003. – № 1 (11). – С. 31-34.
7. Міськів І.Ф. Морфофункціональні зміни ендокринної частини підшлункової залози у щурів старечого віку при стрептозотозиново-му діабеті / І.Ф.Міськів // Прикл. асп. морфології експер. і клін. досліджень: тези доп. наук.-прак. конф. – Тернопіль, 2008. – С. 85-86.
8. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas / T.Szkudelski // Physiol. Res. – 2001. – Vol. 50, № 6. – P. 537-546.
9. Neogenesis vs. apoptosis as main component of pancreatic beta cell changes in glucose – infused normal and mildly diabetic adult rats / C.Bernard, M.Berthault, C.Saulnier [et al.] // FASEB J. – 1999. – Vol. 13, № 10. – P. 1195-1205.
10. Фільченков О.О. Аномоз і рак: від теорії до практики / О.О.Фільченков, Р.С.Стойка. – Тернопіль, 2005. – С. 63 -67.
11. Activation of mitochondria and release of mitochondrial apoptogenic factors by betulinic acid / S.Fulda, C.Scaffidi, S.A.Susin [et al.] // J. Biol. Chem. – 1998. – Vol. 273. – P. 33942-33948.
12. Каширина Н.К. Состояние поджелудочной железы при хронической свинцовой интоксикации / Н.К.Каширина, О.В.Степанова // Biomedical and Biosocial Anthropology. – 2004. – № 2. – С. 156-157.

ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ И ЭЛЕКТРОННОМИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НА ФОНЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА

Резюме. Показано, что при экспериментальном сахарном диабете в поджелудочной железе крыс уменьшается количество В-инсулоцитов с альдегид-фуксифильным компонентом и происходит модификация интенсивности ШИК-позитивного материала. Электронномикроскопически установлены деструктивные изменения морфологии В- и А-инсулоцитов, клеточных элементов ацинусов и компонентов гемокапилляров микроциркуляторного русла эндокринной и экзокринной частей поджелудочной железы.

Ключевые слова: поджелудочная железа, стрептозотцин, гистохимия, электронная микроскопия.

HISTOCHEMICAL AND ELECTRONIC MICROSCOPIC INVESTIGATIONS OF THE PANCREAS IN RATS AGAINST A BACKGROUND OF EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS

Abstract. It has been demonstrated that the number of B-insulocytes with the aldehyde-fuchsinophilous component decreases and a modification of the intensity of the PAS-positive material takes place in experimental diabetes mellitus in the rat pancreas. Destructive changes of the morphology of B and A-insulocytes, the cellular elements of the acini and components of the hemocapillaries of the microcirculatory bed of the endocrine and exocrine portions of the pancreas have been established by means of electron microscopy.

Key words: pancreas, streptozotocin, histochemistry, electron microscopy.

Danylo Halytskyi National Medical University (Lviv)

Надійшла 15.12.2008 р.

Рецензент – проф. С.А.Кашенко (Луганськ)

Науково-практична конференція

**"Актуальні питання
дитячої хірургії"**

**27 травня 2009 року
м. Дніпропетровськ**

Адреса оргкомітету:

Дніпропетровська державна медична академія
вул. Космічна, 13
м. Дніпропетровськ, 49100; тел. (056)7136311, факс
(056)7136610