
МОРФОЛОГИЯ

**А. В. Смирнов, Г. Л. Снигур, А. Т. Яковлев, Д. С. Медников,
Д. В. Куркин, Е. В. Волотова, Л. Н. Кириченко**

Волгоградский государственный медицинский университет,
кафедра патологической анатомии, кафедра фармакологии и биофармации ФУВ,
кафедра биологии, кафедра клинической лабораторной диагностики
с курсом клинической лабораторной диагностики ФУВ;
Волгоградский медицинский научный центр,
лаборатория морфологии, иммуногистохимии и канцерогенеза

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В ЭНДОКРИННОЙ ЧАСТИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРЫС ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО СТРЕПТОЗОТОЦИН-ИНДУЦИРОВАННОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА

УДК 616.379-008.64-085.252.349

Проведено экспериментальное моделирование сахарного диабета путем однократного внутривенного введения стрептозотоцина (50 мг/кг). При морфометрическом исследовании эндокринного аппарата поджелудочной железы крыс с экспериментальным стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом обнаружено значимое снижение площади и периметра панкреатических островков, что позволяет рассматривать вышеуказанные морфометрические параметры в качестве базовых при характеристике островкового аппарата поджелудочной железы крысы при моделировании данной патологии.

Ключевые слова: сахарный диабет, поджелудочная железа, патогистология.

**A. V. Smirnov, G. L. Snigur, A. T. Yakovlev, D. S. Mednikov,
D. V. Kurkin, E. V. Volotova, L. N. Kirichenko**

QUANTITATIVE CHARACTERISTICS OF PATHOLOGICAL CHANGES IN ENDOCRINE PANCREAS IN RATS WITH EXPERIMENTAL STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES

Experimental diabetes mellitus was modeled by a single intravenous injection of streptozotocin (50 mg / kg). A significant reduction in the area and perimeter of the pancreatic islets in rats with experimental streptozotocin-induced diabetes mellitus was reported. This finding allows us to use these parameters as the basic ones when characterizing the endocrine pancreas in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus.

Keywords: diabetes mellitus, pancreas, histopathology.

В настоящее время уровень заболеваемости сахарным диабетом (СД) в мире достиг эпидемических показателей. Темпы роста, ранняя инвалидизация и высокая летальность позволяют отнести СД в разряд глобальных медико-социальных проблем здравоохранения [3].

По оценке Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), количество больных СД в 2010 г. составляло около 285 млн человек, то есть это заболевание было диагностировано примерно у 6 % населения планеты. СД, наряду

с атеросклерозом и онкологическими заболеваниями, назван одной из лидирующих причин смертности и инвалидности жителей разных стран и континентов. Согласно прогнозам ВОЗ, смертность от СД особенно высока в странах с низким и средним уровнем дохода на душу населения, прогнозируется дальнейший рост смертности от этого заболевания.

В Российской Федерации СД встречается у 1–2 % населения, по обращаемости этот показатель достигает 2 млн больных диабетом

(около 300 тыс. больных, страдающих диабетом I типа, и 1 млн 700 тыс. – диабетом II типа), однако фактическая распространенность СД в 3–4 раза превышает регистрируемую, что свидетельствует о пандемии СД среди взрослого населения [12].

Механизм деструкции β -клеток поджелудочной железы сложен [13], количество и объем островков у больных диабетом I типа, а также количество инсулина, экстрагируемого из поджелудочной железы, у этих больных снижено по сравнению с нормой. Некоторые авторы называют такие островки «атрофическими», так как количество в них β -клеток резко уменьшено.

Значительным прорывом в понимании механизмов деструкции β -клеток поджелудочной железы явились исследования биологической значимости оксида азота (NO).

Длительное время о месте образования и биологической функции оксида азота судили косвенно по экспрессии NO-синтазы. Оказалось, что в организме имеется несколько изоформ NO-синтазы, две из которых называются основными конститутивными (эндотелиальная и нейрональная) и третья изоформа – индуцибельная (iNO-синтаза) [4]. L-аргинин под воздействием NO-синтазы превращается в L-цитруллин и оксид азота. В случае взаимодействия L-аргинина с эндотелиальной или нейрональной NO-синтазой образующийся оксид азота участвует в процессах передачи различных сигналов внутри клетки, или обеспечивая межклеточные взаимодействия (в нервной и других системах), оказывает прямое влияние на тонус периферических сосудов [4].

Уникальной функцией (цитотоксическая и цитостатическая) обладает оксид азота, образующийся под воздействием индуцибельной iNO-синтазы [2, 9]. Исследованиями последних лет показано, что именно оксиду азота, который образуется в островках и β -клетках поджелудочной железы, принадлежит основная роль в механизмах разрушения и гибели β -клеток, что и приводит к резкому уменьшению их количества и развитию клинического СД [6].

В результате действия проапоптогенных сигналов происходит активация каспаз первого эшелона 8 и 9, которые активируют эффекторную каспазу 3, а они, в свою очередь, активируют ряд других протеаз семейства каспаз и фактор фрагментации ДНК, что ведет к необратимому распаду ДНК на нуклеосомальные фрагменты [5, 7]. Баланс клеточной популяции в панкреатических островках поддерживается благодаря равновесию между процессами пролиферации и апоптоза [8].

Несмотря на накопленный арсенал морфологических методов оценки иммунофенотипа и клеточного состава островкового аппарата поджелудочной железы, остается актуальным вопрос выбора морфометрических показателей при проведении количественного анализа панкреатических островков при сахарном диабете, предложено использование следующих показателей: относительный и абсолютный размер α - и β -эндокриноцитов; относительный и абсолютный размер ядер α - и β -эндокриноцитов; площадь (объемная доля) занимаемая α - и β -клетками по отношению к панкреатическому островку; площадь (объемная доля) островков Лангерганса по отношению к ткани поджелудочной железы; индекс пролиферативной активности, индекс апоптоза (процент иммунопозитивных клеток на 100 исследуемых клеток); площадь (объемная доля), диаметр секреторных гранул α -, β - и других эндокринных клеток [1, 11].

Однако сравнительная характеристика значимых изменений различных морфометрических параметров панкреатических островков при экспериментальном моделировании СД представлена отрывочно.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить некоторые морфометрические параметры островков Лангерганса при экспериментальном моделировании стрептозотоцин-индуцированного СД у крыс.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование было выполнено на 30 крысах – самцах линии Wistar с массой 180–210 г, разделенных на 2 равные группы: группа интактных животных, группа с экспериментальным СД (ЭСД). ЭСД вызывали путем однократного внутривенного введения стрептозотоцина (50 мг/кг). В дальнейший эксперимент отбирались животные с уровнем глюкозы в крови 12–15 ммоль/л [4]. Забор тканей для патогистологического исследования осуществляли на 21-е сутки эксперимента.

Для патогистологического исследования поджелудочную железу разделяли на фрагменты, которые фиксировали в 10 %-м нейтральном забуференном формалине. Парафиновые срезы толщиной 4–5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином по общепринятым методикам [11, 15].

Морфометрический анализ проводили с помощью компьютерной программы «Видео Тест-Морфо-4» (Россия). Определяли периметр островков (L, мкм); площадь островков (S, мкм²).

Результаты экспериментов обрабатывались методами базисного статистического анализа на ПК с использованием программ Excel Microsoft Office (Microsoft, USA) и STATISTICA 6.0 (Stat Soft Inc., USA). Анализ параметров при нормальном распределении значений проводили с помощью критерия Стьюдента с вероятностью ошибки $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Развитие стрептозотоцин-индуцированного ЭСД по сравнению с контрольной интактной группой животных сопровождалось статистически достоверными ($p < 0,05$) изменениями клинико-биохимических показателей: снижением массы тела, увеличением потребления жидкости, гипергликемией и уменьшением концентрации инсулина и С-пептида плазмы крови, увеличением концентрации гликозилированного гемоглобина.

При гистологическом исследовании в поджелудочной железе отмечалось очаговое полнокровие. В междольковой соединительной ткани в отдельных случаях наблюдалась очаговая лимфоидная инфильтрация, интерстициальный отёк. Панкреатические островки имели неправильную форму, неровные контуры. Их размеры и количество резко уменьшались по сравнению с контролем. Кровеносные капилляры островков были полнокровны. Отмечалась умеренная гипертрофия отдельных эндокриноцитов и их ядер.

При морфометрическом исследовании обнаружено, что средняя площадь панкреатических островков у интактных животных составила ($6885,16 \pm 969,30$) мкм², а средний периметр панкреатических островков у интактных животных был ($364,45 \pm 20,70$) мкм. При моделировании ЭСД (контрольные крысы) площадь панкреатических островков составила ($1179,01 \pm 47,20$) мкм², а периметр панкреатических островков у контрольных животных ($145,93 \pm 6,0$) мкм. При сравнительном анализе результатов морфометрического исследования выявлено значимое снижение площади панкреатических островков на 82,9 % ($p < 0,001$), сопровождающееся достоверным уменьшением их периметра на 60,0 % ($p < 0,001$), что свидетельствует о резко выраженной убыли инсулоцитов под влиянием стрептозотоцина по сравнению с контрольной группой.

Несмотря на то, что достоверное изменение площади, занимаемой островками Лангерганса, было обнаружено на моделях стрептозотоцин- и аллоксан-индуцированного ЭСД [11, 14, 15], исследование периметра панкреатических островков может рассматриваться как

дополнительный морфометрический показатель, характеризующий размеры эндокринного аппарата поджелудочной железы, поскольку для формирования объективного суждения о морфогенезе патологического процесса в целом необходимо принимать во внимание целый ряд характеристик, которые могут значительно отличаться по амплитуде и даже направленности отклонений.

Так, при изучении объемной доли островков Лангерганса при стрептозотоцин-индуцированном ЭСД у крыс не было обнаружено достоверного снижения данного морфометрического параметра [10]. Кроме того, для объективизации суждения о характере структурных изменений различных клеточных популяций внутри панкреатических островков необходимо проведение морфологического исследования с иммунофенотипированием эндокриноцитов, определением их процентного соотношения и объемной доли β -инсулоцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при морфометрическом исследовании эндокринного аппарата поджелудочной железы крыс с экспериментальным стрептозотоцин-индуцированным СД обнаружено значимое снижение площади и периметра панкреатических островков, что позволяет рассматривать вышеуказанные морфометрические параметры в качестве базовых при характеристике островкового аппарата поджелудочной железы крысы при моделировании ЭСД.

ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г. Г. Основы количественной патологической анатомии. – М.: Медицина. – 2002. – 240 с.
2. Влияние комбинированного стресса на морфологические изменения и экспрессию NO-синтазы в вентральном отделе гиппокампа крыс / А. В. Смирнов, И. Н. Тюренков, М. В. Шмидт и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. – Т. 160, № 7. – С. 110–114.
3. Дедов И. И. Сахарный диабет: развитие технологий в диагностике, лечении и профилактике (пленарная лекция) // Сахарный диабет. – 2010. – № 3. – С. 6–13.
4. Изучение влияния сулодексида на эндотелий зависимую вазодилатацию мозговых сосудов у животных со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом / И. Н. Тюренков, А. В. Воронков, А. А. Слещанс и др. // Экспериментальная диабетология. – 2011. – № 3. – С. 12–15.
5. Кротова Ю. Н., Каркищенко В. Н., Хлопонин Д. П. Роль апоптоза в патологии миокарда // Биомедицина. – 2005. – № 1. – С. 17–34.
6. Механизмы токсического действия стрептозотоцина на β -клетки островков Лангерганса / В. Б. Писарев, Г. Л. Снигур, А. А. Спасов и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины – 2009. – Т. 148, № 12. – С. 700–702.

7. *Мушкамбаров Н. Н., Кузнецов С. Л.* Молекулярная биология. – М.: МИА, 2003. – 544 с.

8. Нозологическая гетерогенность, молекулярная генетика и иммунология аутоиммунного сахарного диабета / И. И. Дедов, М. В. Шестакова, Т. Л. Кураева и др. // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2015. – Т. 70, № 2. – С. 132–138.

9. Роль NO-системы в морфогенезе заживления кожных ран при сахарном диабете / А. В. Смирнов, Н. Г. Паньшин, А. А. Слиецанс и др. // ВМЖ. – 2014. – № 4. – С. 10–14.

10. *Снигур Г. Л.* Лекарственный патоморфоз эндокринной части поджелудочной железы при экспериментальном сахарном диабете: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Волгоград, 2012. – 40 с.

11. *Снигур Г. Л., Смирнов А. В.* К вопросу стандартизации патогистологической диагностики сахарного диабета // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2010. – № 3 (35). – С. 112–115.

12. *Уоткинс П. Дж.* Сахарный диабет / Под ред. М. И. Балаболкина; пер. с англ. Д. Е. Колоды. – 2-е изд. – М.: БИНОМ, 2006. – 134 с.

13. Экспериментальная модель диабетической нефропатии у крыс / А. А. Спасов, А. В. Смирнов, О. А. Соловьева и др. // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2015. – № 3 (35). – С. 36–40.

14. Rat model of food-induced non-obese-type 2 diabetes mellitus: comparative pathophysiology and histopathology / A. O. Adeyi, B. A. Idowu, C. F. Mafiana, et al. // Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol. – 2012. – Vol. 4 (1). – P. 51–58.

15. *Sun G., Qi Y., Pan Q.* Quantitative analysis of prevention effect of tetrandrine on pancreatic islet beta cells injury in rats // Zhonghua Yi Xue Za Zhi. – 1997. – Vol. 77 (4). – P. 270–273.