

УДК 577.178.14+616.379-008.64+616-092.4/9

Иммунорфологическая характеристика процессов репликации и неогенеза инкреторных клеток поджелудочной железы крыс на индуцированной модели стрептозотоцинового диабета

Е. М. Агаджанова

*Кафедра эндокринологии, Научно-исследовательский центр
ЕГМУ им.М.Гераци
0025, Ереван, ул.Корюна, 2*

Ключевые слова: диабет, поджелудочная железа, β -клетки, репликация, неогенез, BrdU-позитивные клетки

Стрептозотоциновая модель диабета в настоящее время является наиболее приемлемой для изучения механизмов, лежащих в основе поражения β -клеток островкового аппарата и формирования репаративно-пролиферативных процессов, направленных на восстановление структуры и инкреторной функции поджелудочной железы [1,3,4,10].

При изучении механизмов повреждения островков Лангерганса отмечается определенное противоречие между значимостью местных, локальных провоцирующих факторов, с одной стороны, а с другой – нарушением системной регуляции и, в первую очередь, иммунной и нейроэндокринной систем [2,5,6]. Более того, работами израильских исследователей [8] показано, что степень пролиферации взрослых β -клеток *in vivo* и их регенерация, следующая за действием повреждающих агентов, контролируются системными факторами.

Несмотря на многочисленные исследования, проведенные на модели стрептозотоцинового стресса, и по сей день отсутствуют научные разработки, посвященные структурным изменениям инкреторного аппарата именно в динамике течения регионального патологического процесса. В связи с этим открытым остается также вопрос, касающийся механизмов восстановления структуры и функции эндокриноцитов, т.е. путем неогенеза или репликации.

Целью настоящего исследования послужило изучение структурных изменений в островковом аппарате поджелудочной железы в динамике течения индуцированного в эксперименте стрептозотоцинового диабета.

Материал и методы

Опыты ставились на 48 белых крысах-самцах массой 180-200г. Животные были разделены на две группы: контрольную и опытную. Животным опытной группы (36 крыс) однократно внутрибрюшинно вводили стрептозотоцин (Sigma, США) в дозе 55 мг/кг. Животные опытной группы были подразделены на три подгруппы. Животные первой подгруппы выводились из эксперимента на 2-е сутки после введения стрептозотоцина, животные второй – на 4-е сутки, третьей – на 8-е сутки эксперимента. Животные выводились из эксперимента путем декаптации, под нембуталовым наркозом (40 мг/кг в/б). Работа проводилась в соответствии с требованиями ЕС по работе с лабораторными животными и была одобрена Этическим комитетом ЕГМУ.

Парафиновые срезы окрашивались гематоксилин-эозином и азур II эозином. Свежезамороженные криостатные срезы подвергали иммуноферментному анализу на предмет выявления в поджелудочной железе BrdU-позитивных клеток с целью выявления наличия пролиферации [7]. Указанный иммуноферментный анализ проводили согласно предложенной Schutte V. et al. схеме [9]. Животным контрольной и опытных подгрупп внутрибрюшинно однократно вводили 5-bromodeoxyuridine (BrdU) (Sigma, США) в дозе 50 мг/кг, через час после этого животных забивали. Готовили свежезамороженные криостатные срезы, которые фиксировали в метиловом спирте в течение 30-40 мин. После фиксации срезы инкубировали в 2 N HCl в течение 30 мин при 37°C. Препарат промывали в 0,1M фосфатном буфере, после чего на срезы наносили 0,1M боратный буфер, pH 8,5. После промывания и высушивания на препараты наносили моноклональную мышиную сыворотку против 5-bromodeoxyuridine (Sigma, США) в разведении 1:40. Через 40 минут препарат промывали в 0,1 M фосфатном буфере, высушивали. После высушивания на срезы наносили меченную ФИТЦ козлиную сыворотку против IgG мыши (Sigma) в разведении 1:10. Препарат промывали три раза 0,1M фосфатным буфером, высушивали и просматривали под люминесцентным микроскопом ВОЕСО (Германия).

Результаты и обсуждение

На 2-е сутки после введения стрептозотоцина в поджелудочной железе доминировали катаболические процессы, с преимущественной их локализацией в инкреторном аппарате. Структурным проявлением этих процессов выступали альтерационные изменения в островках Лангерганса. Так, в большинстве островков наблюдались признаки дисконфлексии инкреторных клеток, вакуолизация цитоплазмы, некроз и рексис ядер. В тех же островках весьма часто встречались очаги микронекроза.

На 4-е сутки после введения стрептозотоцина в поджелудочной железе продолжали доминировать катаболические процессы. Однако на этом фоне имело место оживление репаративно-пролиферативных процессов как в экзо-, так и в эндокринном аппарате, которые носили очаговый характер. Так, весьма часто встречались мелкие лентовидной конфигурации инкреторные островки с относительно компактной ориентацией в них секреторных клеток. Как правило, подобные островки выделялись в непосредственной близости от внутريدольковых протоков. В отдельных относительно крупных островках, в которых ранее наблюдались сугубо деструктивные процессы, на 4-е сутки эксперимента наблюдались признаки репликации эндокриноцитов. "Новые" секреторные клетки (единичные) выявлялись повсеместно, как на периферии островков – в участках локализации α -инкреторных клеток, так и в центральных отделах – в участках преимущественной локализации β -клеток. Цитоплазма подобных гипертрофированных клеток выглядела слабобазофильной, резко вакуолизированной, ядра – гиперхромными, в состоянии пикноза. В отдельных межацинарных и междольковых протоках наблюдались признаки активации эпителиоцитов, которые носили сугубо очаговый характер. Как показали результаты иммуноморфологического анализа, именно в островках, в которых, наряду с дистрофическими и деструктивными изменениями, имели место репаративно-пролиферативные сдвиги, в структурно "сохранных" единичных инкреторных клетках наблюдалось специфическое свечение, которое свидетельствовало о наличии накопления BrdU в составе ядер новообразованных секреторных клеток. Аналогичное специфическое свечение было зарегистрировано в отдельных клетках, выстилающих внутреннюю поверхность межацинарных и междольковых протоков. Наличие единичных BrdU-позитивных клеток наблюдалось также и в отдельных ацинусах, особенно в участках, прилежащих к панкреатическим протокам.

На 8-е сутки после введения стрептозотоцина в поджелудочной железе доминировали анаболические процессы, которые наиболее рельефно проявлялись в ее инкреторном аппарате. Так, весьма часто встречались относительно крупные овальной формы островки Лангерганса, в которых цитоархитектоника инкреторных клеток была сохранена. Эндокриноциты характеризовались равномерным и относительно компактным расположением по всему периметру островков. В отличие от предыдущего срока наблюдения (на 4-е сутки после введения стрептозотоцина) признаков неогенеза инкреторных клеток в панкреатических островках не наблюдалось.

Таким образом, на модели стрептозотоцинового диабета были изучены структурные изменения в эндокринном и экзокринном аппарате поджелудочной железы в динамике течения регионального патологического процесса. На конкретном этапе течения экспериментального

индуцированного диабета у крыс (на 4-е сутки эксперимента) в островковом аппарате поджелудочной железы и в ее протоках наблюдались признаки оживления репаративных процессов. Выявлены также возможные региональные механизмы восстановления указанных микроструктур поджелудочной железы, о чем свидетельствует обнаружение BrdU-позитивных клеток по итогам проведенного нами иммуноферментного анализа. Восстановление структурной организации островкового аппарата происходило за счет регенерации «выживших» β -клеток, т.е. путем репликации. Альтернативным источником появления новых инкреторных клеток, согласно данным иммуноморфологического анализа на предмет выявления BrdU-позитивных клеток, служили эпителиоциты внутريدольковых и междольковых протоков. В данном случае восстановление массы β -клеток островкового аппарата происходило за счет "трансформации" эпителиоцитов в эндокриноциты.

Поступила 28.04.14

**Շաքարախտի ստրեպտոզոտոցինային մոդելի վրա
ենթաստամոքսային գեղձի ինկրետոր բջիջների ռեպլիկացիայի և
նեոգենեզի իմունաձևաբանական բնութագիրը**

Ե. Մ. Աղաջանովա

Առնետների մոտ ինդուկցված ստրեպտոզոտոցինային շաքարախտի ժամանակ իմունաձևաբանական եղանակներով ուսումնասիրվել են ռեպարատիվ-պրոլիֆերատիվ շարժընթացի առանձնահատկությունները: Հայտնաբերվել են BrdU-դրական բջիջներ, ինչը վկայում է տեղային մեխանիզմների առկայության մասին, որոնք ընկած են ենթաստամոքսային գեղձի կղզյակային կառույցի β -բջիջների ռեպլիկացիայի և նեոգենեզի հիմքում:

**Immunomorphological characteristics of the replication processes
and neogenesis in incretory cells of pancreas in streptozotocin-
induced model of diabetes in rats**

Y. M. Aghajanova

By means of immunomorphological methods the character and the peculiarities of the reparative-proliferative processes were studied in dynamics of streptozotocin-induced diabetes in rats. There were revealed BrdU-positive

cells that is evidence of regional mechanisms of pancreatic islands β -cells replication and neogenesis.

Литература

1. *Aghajanova Y.M., Mkrtychyan L.N., Zilfyan A.V., Avagyan S.A.* Immune-endocrine antitumor modulator dependent mechanisms in restoration of the incretory function of pancreas in streptozotocin-induced rat model of diabetes. *The New Armenian Med. J.*, 2012; 6(4): 25-35.
2. *Aghajanova Y.M.* EATM decreases *ex vivo* releasing of NADPH-oxidases from erythrocyte membranes and blood serum of patients with diabetes types 1 and 2. *The New Armenian Med. J.*, 2013; 7(3): 23-31.
3. *Belkacemi L., Selselet-Attou G., Hupkens E., Ngudjoe E., Louchami K., Sener A., Malaisse W.* Intermittent fasting modulation of the diabetic syndrome in streptozotocin-injected rats. *Int. J. Endocrinol.*: Published online, 2012 January 12. doi: 10.1155/2012/962012.
4. *Bernard K., Berthault M-F., Saulnier C., Ktirza A.* Neogenesis vs. apoptosis as main components of pancreatic β -cell mass changes in glucose-infused normal and mildly diabetic rats. *The FASEB J.*, 1999; 13(10): 1195-1205.
5. *Gatford K.L., De Blasio M.J., How T.A., Harland M.L., Summers-Pearce B.L., Owens J.A.* Testing the plasticity of insulin secretion and β -cell function in vivo: responses to chronic hyperglycaemia in the sheep. *Exp. Physiol.*, 2012; 97(5): 663-675.
6. *Heit J.J., Karnik S.K., Kim S.K.* Intrinsic regulators of pancreatic beta-cell proliferation. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 2006; 22: 311-338.
7. *Henry Sh., Bigler, Wang J.* High throughput analysis of neural progenitor cell proliferation in adult rodent hippocampus. *Biosci. Trends*, 2009; 3(6): 233-238.
8. *Porat Sh., Weinberg-Corem N., Tomovsky-Babaey Sh., Schyr-Ben-Haroush R., Hija A. et al.* Control of pancreatic β -cell regeneration by glucose metabolism. *Cell Metabol.*, 2011; 13: 440-449.
9. *Schutte B., Reynders M.M., van Assche C.L., Hupperets P.S., Bosman F.T., Blijham G.H.* An improved method for the immunocytochemical detection of bromodeoxyuridine labeled nuclei using flow cytometry. *Cytometry*, 1987; 8(4): 372-376.
10. *Zhang Y., Zhang Y., Bone R.N., Cui W., Peng I-B. et al.* Regeneration of pancreatic non β -endocrine cells in adult mice following a single diabetes-inducing dose of streptozotocin. *PLoS ONE*, 2012, 7(5): e36175. doi:10.1371/journal.pone0036675).