

ВПЛИВ МЕЛАТОНІНУ НА СТАН ОСТРІВЦІВ ЛАНГЕРГАНСА ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ В АЛОКСАНДІАБЕТИЧНИХ ЩУРІВ

О. Ю. Кушнір, І. С. Давиденко
Буковинський державний медичний університет, м. Чернівці

У роботі вивчали вплив препарату мелатоніна на морфологічну структуру острівців Лангерганса підшлункової залози щурів з явною і прихованою формами цукрового діабету типу 1, спровокованого введенням алоксана. Введення препарату мелатоніна щурам в дозі 10 міліграм/кг впродовж 7 днів сприяло відновленню, але з різною ефективністю, морфологічної структури підшлункової залози.

Ключові слова: мелатонін, алоксановий діабет, острівці Лангерганса, щури.

Цукровий діабет (ЦД) – за визначенням експертів ВООЗ, це стан хронічної гіперглікемії, зумовлений порушенням утворення або дії інсуліну. Відомо, що морфологічним субстратом інсулінзалежного (ЦД) є запалення, яке локалізується в острівці Лангерганса, веде до деструкції бета-клітин і дисфункції решти клітинних типів. Дане запалення носить аутоімунний характер і викликає загибель бета-клітин, переважно шляхом апоптозу [2]. Завданням протидіабетичних препаратів є нормалізування рівня глюкози та сприяння регенерації бета-клітин підшлункової залози (ПЗ), відновлення вторинних порушень обміну речовин. Кількість хворих на (ЦД) невпинно зростає, а сам діабет “молодшає”. Тому, розробка нових підходів до фармакотерапії цього захворювання залишається актуальним на сьогодні питанням. Перспективним у цьому плані є дослідження впливу мелатоніну на стан острівців Лангерганса ПЗ [3].

Метою роботи було дослідження впливу мелатоніну на стан острівців Лангерганса підшлункової залози щурів при алоксановому цукровому діабеті за умов природного освітлення.

Матеріал і методи дослідження. Експерименти проведені на 94 статевозрілих самцях безпородних білих щурів масою 0,18 - 0,20 кг. Тварин утримували за умов природного освітлення та вільного доступу до води та їжі. Досліди проведені в лютому-березні 2009 року. Алоксановий діабет, викликали шляхом уведення щурам 5%-го розчину алоксану моногідрату внутрішньоочеревинно в дозі 170 мг/кг одноразово, після 24-годинного голодування [5]. Кров для дослідження відбирали з хвостової вени. Визначення рівня базальної глікемії (БГ) проводили за допомогою приладу One Touch Ultra Easy (виробник "Johnson & Johnson", США) [1]. На третю (критичну) добу спостерігалась загибель 50% алоксандіабетичних щурів. Дослідних тварин було розділено на сім груп: 1) інтактні щури (контрольна група); 2) контрольна група щурів, яким впродовж тижня щоденно о 8 годині ранку внутрішньоочеревинно вводили препарат мелатоніну в дозі 10 мг/кг [11]; 3) щури з явним цукровим діабетом; 4) щури з явним цукровим діабетом, яким починаючи з 5-ої доби після введення алоксану впродовж тижня щоденно о 8 годині ранку внутрішньоочеревинно вводили препарат мелатоніну в дозі 10 мг/кг; 5) щури з явним цукровим діабетом, які починаючи з 5-ої доби після введення алоксану отримували ін'єкції інсуліну (Фармасулін Н НР, виробник ВАТ "Фармак", Україна) з розрахунку, що 1 ОД інсуліну утилізує 2 ммоль/л глюкози; 6) щури з прихованим цукровим діабетом; 7) щури з прихованим цукровим діабетом, яким впродовж тижня вводили мелатонін. У роботі був використаний препарат мелатоніну (виробник "Sigma", США), який вводили алоксандіабетичним щурам впродовж семи днів щоденно внутрішньоочеревинно в дозі 10 мг/кг починаючи з 5-ї доби після введення алоксану. Тварин забивали шляхом декапітації на 12-ту добу від початку експерименту у відповідності до етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2000), що узгоджується з положеннями Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей. Отриманий орган фіксували в 10% нейтральному буферному розчині формаліну. Далі шматочки тканини зневоднювали і заливали в парафін за стандартною методикою. Зрізи тканин товщиною 5 ± 1 мкм отримували на санному мікротомі [4]. Гістологічне дослідження ПЗ проводили згідно методики фарбування зрізів тканини з використанням паральдегідного фуксину по Гоморі та згідно методики гематоксилін-еозин [13]. Мікрофотографування і морфометричне дослідження проводили на універсальному дослідницькому мікроскопі ЛЮМАМ – Р8 (Росія, Ломо) з використанням цифрової фотокамери Olympus C 740 UZ [4]. Статистичну обробку результатів дослідження проводили за Стьюдентом.

Результати дослідження та їх обговорення. Алоксан, як відомо, вибірково пошкоджує значну частину бета-клітин острівкової тканини ПЗ [12]. Згідно отриманих результатів (таблиця 1), у частини щурів уведення алоксану моногідрату викликало різке зростання рівня базальної глікемії натще (на 139% порівняно з показниками контрольної групи тварин); такі тварини сформували групу щурів із явним цукровим діабетом ($БГ \geq 8,0$ ммоль/л [6]).

Таблиця 1

Рівень базальної глікемії натще (ммоль/л), ($m \pm m$)

Групи	Показники	На 4-ту добу (до введення засобів корекції)
1. Інтактний контроль, n=12		$5,6 \pm 0,44$
2. Контроль + мелатонін, n=6		$5,7 \pm 0,72$
3. Явний цукровий діабет, n=6		$11,1 \pm 2,45^a$
4. Явний цукровий діабет + інсулін, n=6		$11,2 \pm 1,40^a$
5. Явний цукровий діабет + мелатонін, n=6		$10,3 \pm 0,95^a$
6. Прихований цукровий діабет, n=13		$5,2 \pm 0,36^b$
7. Прихований цукровий діабет + мелатонін, n=7		$5,2 \pm 0,31^b$

a - зміни вірогідні стосовно інтактного контролю ($p < 0,05$), b - зміни вірогідні стосовно явного цукрового діабету ($p < 0,05$), c - зміни вірогідні стосовно прихованого цукрового діабету ($p < 0,05$)

У решти алоксандіабетичних тварин рівень базальної глікемії вірогідно не відрізнявся від показників інтактних щурів ($БГ \leq 6,9$ ммоль/л) [5]; таких тварин було об'єднано в групу алоксандіабетичних щурів із прихованим цукровим діабетом. Ендокринна частина нормальної ПЗ представлена (рис. 1.) острівцями Лангерганса – скупченнями ендокринних клітин навколо капілярів. Абсолютні розміри острівців становили від 54 до 312 мкм. Екзокринну частину утворюють ацинуси, які складаються з секреторних клітин. Кровоносні судини проходять в міждольковій сполучній тканині [8]. Показники групи контрольних тварин, яким впродовж 7 днів

уводили препарат мелатоніну, візуально (рис.2.) і за морфометричними (таблиця 2) параметрами вірогідно не відрізнялися від показників контролю.

Таблиця 2

Морфометричні параметри острівців Лангерганса, (M±m)

Показники	Питома вага острівців Лангерганса (%)	Середня кількість клітин на зріз	β-клітини (%)	Клітини з некрозом (%)
Інтактний контроль, n=12	0,948±0,0127	82±1,2	44,0±1,53	-
Контроль + мелатонін, n=6	0,986±0,0113	85±1,7	45,2±1,08	-
Явний цукровий діабет, n=6	0,084±0,0028 ^a	6±0,4 ^a	0,2±0,04 ^a	97,0±2,35 ^a
Явний цукровий діабет + інсулін, n=6	0,345±0,0164 ^{a,b}	22±0,4 ^{a,b}	0,2±0,06 ^a	10,1±0,60 ^{a,b}
Явний цукровий діабет + мелатонін, n=6	0,589±0,0119 ^{a,b}	45±0,8 ^{a,b}	57,7±1,58 ^{a,b}	4,6±0,36 ^{a,b}
Прихований цукровий діабет, n=13	0,561±0,0084 ^{a,b}	43±0,6 ^{a,b}	4,2±0,29 ^{a,b}	34,0±1,36 ^{a,b}
Прих-й цукровий діабет+мелатонін, n=7	0,675±0,0054 ^{a,b,c}	52±0,8 ^{a,b,c}	61,1±1,04 ^{a,b,c}	2,8±0,28 ^{a,b,c}

a - зміни вірогідні стосовно інтактного контролю (p < 0,05), b - зміни вірогідні стосовно явного цукрового діабету (p < 0,05), c - зміни вірогідні стосовно прихованого цукрового діабету (p < 0,05).

При гістологічному дослідженні на 12-ту добу після введення алоксану в ПЗ тварин з явним (рис. 3.) та прихованим (рис. 6.) ЦД спостерігається різке зменшення кількості клітин в острівцях Лангерганса. Абсолютні розміри острівців становили від 15 до 38 мкм, що у середньому в 6 разів менше ніж у контрольній групі тварин. Питома вага острівців Лангерганса (таблиця 2) в ПЗ тварин з прихованим та явним ЦД у середньому на 40 та 92% відповідно менше показників контрольної групи тварин. Середня кількість клітин на зрізі одного острівця Лангерганса в групі тварин з прихованим та явним ЦД зменшувалася, у порівнянні з контрольною групою, у середньому на 47 і 85% відповідно.

Відсоток бета-клітин серед клітин острівців Лангерганса знижувався в групі тварин з прихованим ЦД у 10,5 рази, а в групі тварин з явним ЦД – у 220 разів, у порівнянні з контролем. Серед клітин острівців Лангерганса значна їх кількість мали ознаки загибелі (у вказаних клітинах має місце гідропічна дистрофія або колікваційний некроз – у групі тварин з прихованим ЦД та наявність клітин з проявами некрозу: одні з ознаками каріопікнозу, інші – початкового або завершеного каріолізісу – у групі тварин з явним ЦД), чого не відмічалось у інтактних тварин. Поширеність вказаного процесу наведена у відсотках у таблиці 2 [8, 10].

Подібні зміни спостерігались і в ПЗ алоксандіабетичних щурів, яким проводили замісну терапію інсуліном (рис. 4.). Питома вага острівців Лангерганса та середня кількість клітин на зрізі одного острівця Лангерганса в цьому випадку у середньому становили на 62 та 73% відповідно менше показників інтактних тварин (проте були вірогідно вищими в 3,1 і 2,6 рази відповідно, ніж показники нелікованих тварин). Бета-клітини серед клітин острівців Лангерганса зустрічалися зрідка. Кількість загиблих клітин зменшувалася у 9,5 разів у порівнянні з нелікованими тваринами, проте присутні клітини з ознаками некрозу (каріолізіс).

В групі алоксандіабетичних тварин з явним (рис. 5.) та прихованим (рис. 7.) ЦД, які отримували препарат мелатоніну, гістологічна структура ПЗ в значній мірі відновлена, але не остаточно. Інсулярна частина представлена великими, острівцями Лангерганса, які досягають 54 – 212 мкм, кількість яких в кожному полі зору 2-3, що складає більше 3% від загальної маси залози (нормальний вміст становить 1%). Питома вага острівців Лангерганса (див. табл. 2) у тварин з прихованим та явним ЦД, яким проводили введення мелатоніну, була у 1,2 та у 7 разів відповідно вище ніж показники контрольних тварин, які не отримували засобів корекції. Середня кількість клітин на зрізі одного острівця Лангерганса у групах тварин з прихованим та з явним ЦД, яким проводили введення мелатоніну була в 1/5 і 2,7 рази відповідно вищою, ніж показники нелікованих тварин. Кількість загиблих клітин у групі тварин з прихованим та явним ЦД, яким вводили мелатонін зменшувалася у 15 і 20 разів відповідно у порівнянні з контролем. У вказаних групах в острівцях Лангерганса присутні клітини з проявами некрозу: одні з ознаками каріопікнозу, інші – початкового або завершеного каріолізісу. У цілому відмічається менша конденсація хроматину (більш «активні» ядра) – у групі тварин з прихованим ЦД у порівнянні з показниками тварин у групі з явною формою ЦД. Відсоток бета-клітин збільшувався у групі тварин з прихованим ЦД в 14 разів, у групі тварин з явним ЦД в 260 разів, у порівнянні з тваринами, які не отримували мелатонін.

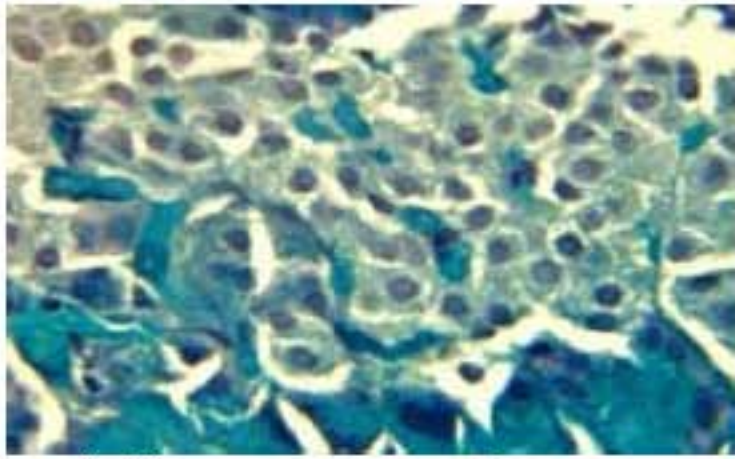


Рис. 1. Підшлункова залоза інтактного щура. Фрагмент острівця Лангерганса. Методика фарбування по Гоморі. Об.40. \times Ок.10 \times .

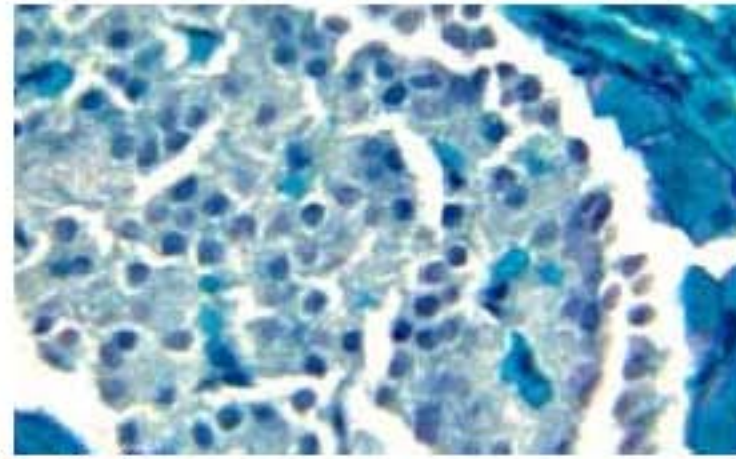


Рис. 2. Підшлункова залоза контрольного щура з мелатоніном. Фрагмент острівця Лангерганса. Методика фарбування по Гоморі. Об.40. \times Ок.10 \times .

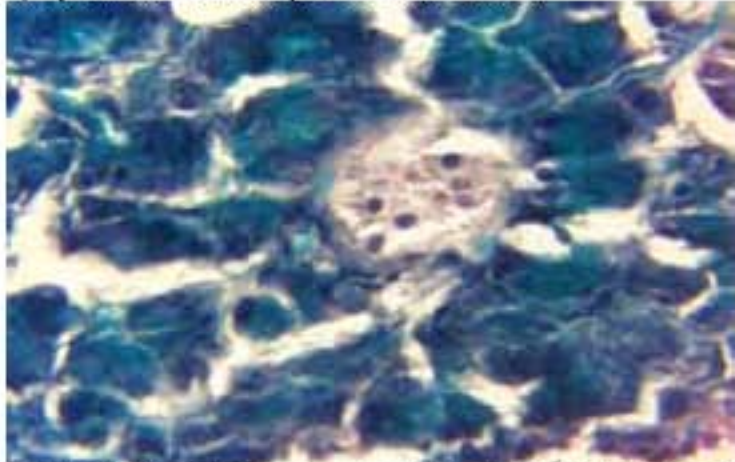


Рис. 3. Підшлункова залоза щура з явним цукровим діабетом. Острівець Лангерганса. Методика фарбування по Гоморі. Об.40. \times Ок.10 \times .

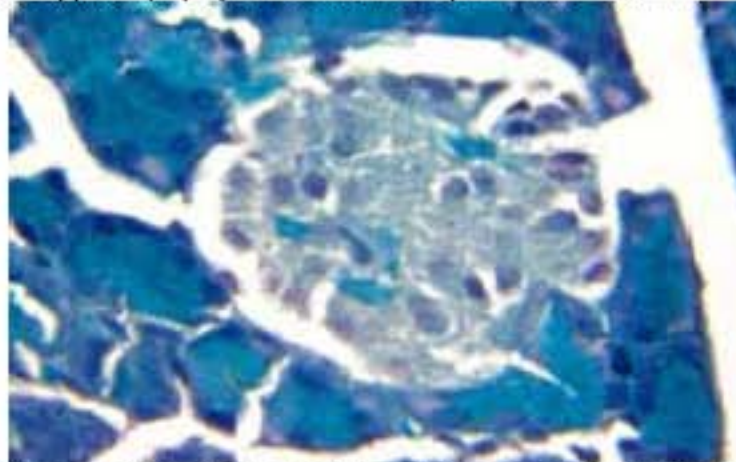


Рис. 4. Підшлункова залоза щура з явним цукровим діабетом, якому вводили інсулін. Острівець Лангерганса. Заб. по Гоморі. Об.40. \times Ок.10 \times .

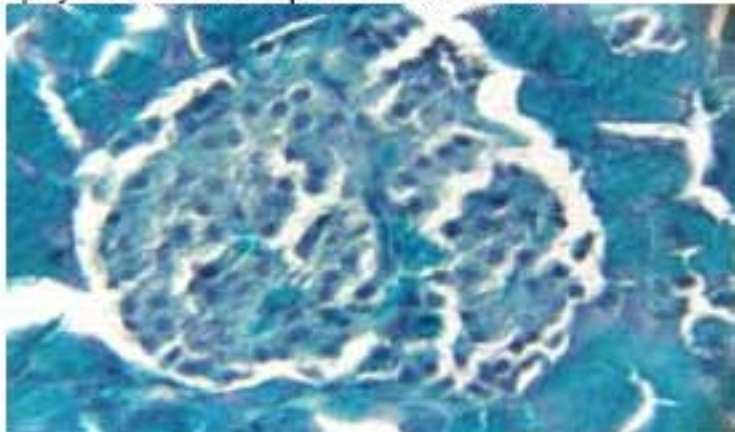


Рис. 5. Підшлункова залоза щура з явним цукровим діабетом, якому вводили мелатонін. Острівець Лангерганса. Заб. по Гоморі. Об.40. \times Ок.10 \times .



Рис. 6. Підшлункова залоза щура з прихованим цукровим діабетом. Фрагмент острівця Лангерганса. Методика фарбування по Гоморі. Об.40. \times Ок.10 \times .

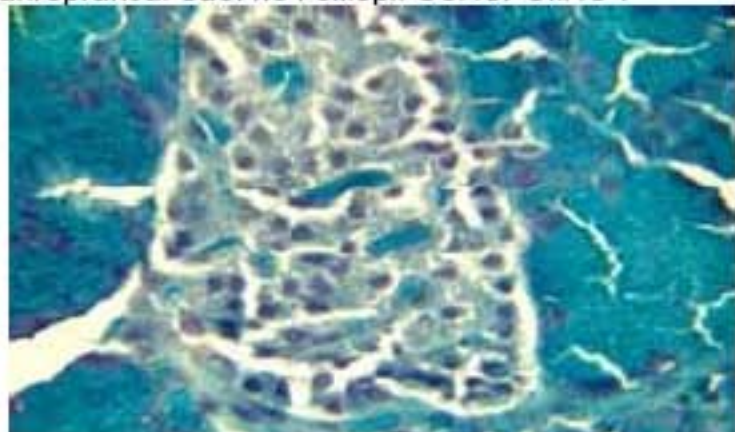


Рис. 7. Підшлункова залоза щура з прихованим цукровим діабетом, якому вводили мелатонін. Острівець Лангерганса. Методика фарбування по Гоморі. Об.40. \times Ок.10 \times .

Позитивний вплив екзогенного мелатоніну на стан бета-клітин ПЗ ймовірно здійснюється завдяки його антиоксидантним та імуномодулюючим властивостям [7, 9]. Адже, основні шляхи руйнування бета-клітин ПЗ при ЦД першого типу пов'язані саме з дією NO (оксиду азоту), який веде до утворення активних радикалів кисню, що ведуть до роз'єднання окисно-відновних процесів в мітохондріях і викликають пошкодження ДНК. При цьому знижується глюкозостимульована секреція інсуліну. Інфільтровані внаслідок розвитку аутоімунного інсулініту острівці Лангерганса містять Т-лімфоцити, які стимулюють реакції клітинного імунітету і пригнічують гуморальний імунітет [2]. При фізіологічній пінеалектомії (цілодобове освітлення) прискорюється розвиток генетично обумовлених аутоімунних

захворювань, включно і ЦД. Окремі дослідники припускають, що мелатонін має здатність регенерувати бета-клітини острівців Лангерганса підшлункової залози [11].

Резюме

Уведення мелатоніну в дозі 10 мг/кг щоденно впродовж 7 днів алоксандіабетичним щурам із явним і прихованим цукровим діабетом виявляє відновлюючий вплив на морфологію острівців ПЗ тварин.

Перспективи подальших досліджень в даному напрямку. У подальшому планується вивчення впливу мелатоніну на гістологічні показники печінки щурів за умов алоксанового діабету.

Література

1. Карягина И. Ю. Лабораторные технологии диагностики и мониторинга сахарного диабета (лекция) / И. Ю. Карягина, Ю.В. Эмануэль // Клиническая лабораторная диагностика. – 2002. - № 5. – С. 25 – 32.
2. Колесник Ю. М. Панкреатические островки: некоторые аспекты морфологии, физиологии и процессов деструкции при сахарном диабете типа 1 / Ю. М. Колесник, М. А. Орловский // Проблемы эндокринологии. – 2004. – Т. 50, №2. – С. 3 – 10.
3. Мелатонин в норме и патологии ; под ред. Ф. И. Комарова, С. И. Рапопорта, Н. К. Малиновской, В. Н. Анисимова. – М. : ИД Медпрактика – М, 2004. – 524с.
4. Морфологические аспекты алоксанового диабета после трансплантации культуры клеток поджелудочной железы (сообщение 3) / В. К. Гринь, В. Ю. Михайличенко, А. А. Селезнев [и др.] // Экспериментальные исследования. – 2004. - № 2. – С.326 – 332.
5. Пальчикова Н. А. Качественная оценка чувствительности экспериментальных животных к диабетогенному действию аллоксана / А. А. Пальчикова, В. Г. Селятинская, Ю. П. Шорин // Проблемы эндокринологии. - 1987. – Т. 33, № 4. – С. 65 – 68.
6. Патологические аспекты алоксанового диабета (сообщение 1) / В. К. Гринь, О. И. Миминошвили, В. Ю. Михайличенко [и др.] // Вестник неотложной и восстановительной медицины. – 2003. – Т.4, №2. – С. 337 – 343.
7. Труфакин В. А. Проблемы центральной регуляции биоритмов иммунной системы. Роль мелатонина / В. А. Труфакин, А. В. Шурлыгина // Вестник российской АМН. – 2006. - № 9 – 10. – С. 121- 127.
8. Шумейко А. Г. Влияние экстракта из мидий на репаративные процессы в поджелудочной железе крыс при экспериментальном сахарном диабете / А. Г. Шумейко, Овсянникова Т. Н., Красова Н. С. И др. // Світ медицини та біології. – 2009. - № 1. – С. 99 – 103.
9. Elmar Peshke Melatonin, endocrine pancreas and diabetes / Elmar Peshke // Journal of Pineal Research. – 2008. - № 44. – P. 26 – 40.
10. Lima L. M. B. Influence of the pineal gland on the physiology, morphometry and morphology of pancreatic islets in rats / L. M. B. Lima, L. C. Reis, M. A. Lima // Rev. Brasil. Biol. – 2001. – V. 2, № 61. – P. 333 – 340.
11. Depression of glucose levels and partial restoration of pancreatic b-cell damage by melatonin in streptozotocin-induced diabetic rats / Mehmet K., Hamdi U., Turan K., Ozdemir S. H. // Arch. Toxicol. – 2006. – Vol. 80, № 6. – P. 362 – 369.
12. Importance of the GLUT 2 glucose transporter for pancreatic beta cell toxicity of alloxan / Elsner M., Tiedge M., Gludbakke B., Munday R., Lenzen S. // Diabetologia. – 2002. – Vol. 45, № 11. – P. 1542 – 1549.
13. Venerucci F. Histopathology kits: methods and applications. – Bologna, Milan: Bio-Optica. – 2001.– 95p.

Реферат

ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА НА СОСТОЯНИЕ ОСТРОВКОВ ЛАНГЕРГАНСА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У КРЫС С АЛОКСАНОВЫМ ДИАБЕТОМ

Кушнир А. Ю., Давыденко И. С.

В работе изучали влияние препарата мелатонина на морфологическую структуру островков Лангерганса поджелудочной железы крыс с явной и скрытой формами сахарного диабета типа 1, спровоцированного введением аллоксана. Введение препарата мелатонина крысам в дозе 10 мг/кг на протяжении 7 дней способствовало восстановлению, но с разной эффективностью, морфологической структуры поджелудочной железы.

Ключевые слова: мелатонин, аллоксановый

INFLUENCE OF MELATONIN ON CONDITION OF THE LANGERGAN'S ISLES OF THE PANCREAS IN ALLOKSANDIABETIC RATS

Kushnir A. Yu., Davydenko I. S.

In work studied the influence of the preparation of melatonin on morphological structure of Langergans isles of the pancreas in the rats with evident and hidden forms of the sugar diabetes of the type 1, provoked by introduction of alloxan. Entering the preparation of melatonin to the rats in dose 10 mg/kg on length 7 days promoted to reconstruction, but with miscellaneous by efficiency, morphological structure of the pancreas.

Keywords: melatonin, alloxan diabetes,