

Использование метода электронной микроскопии для выявления и анализа клинически неявных патогенетических проявлений

Л. Г. Никонова, В. В. Банин*, И. Г. Стельникова

ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России, г. Нижний Новгород, Россия

*ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, Москва, Россия

В результате проведенного электронно-микроскопического исследования В-клеток панкреатических островков поджелудочной железы у собак с нормальной (n=10) и нарушенной (n=10) толерантностью к глюкозе, установлены ультраструктурные особенности организации инсулиноцитов, связанные с повышенной потребностью гормона в организме при латентной форме сахарного диабета. В В-клетках выявлены признаки функционального напряжения вследствие нерегулируемой секреции, которая проявляется гипертрофией комплекса Гольджи, расширением цистерн эндоплазматического ретикулума, возрастанием числа незрелых секреторных гранул и вакуолей в цитоплазме.

Ключевые слова: поджелудочная железа, нарушенная толерантность к глюкозе, инсулиноцит.

© L. G. Nikonova, V. V. Banin*, I. G. Stel'nikova, 2018

Privolzhskiy Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia

*A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia

Using of the Method of Electron Microscopy for the Identification and Analysis of Clinically Implicit Pathogenetic Manifestations

Electron microscopic examination of B cells of pancreatic islets of the pancreas in dogs with normal (n=10) and impaired glucose tolerance (n=10) was performed. Ultrastructural features of the organization of insulin cells associated with an increased requirement of the hormone in the body with the latent form of diabetes mellitus are established. In B cells, signs of functional tension due to unregulated secretion, manifested by the expansion of endoplasmic reticulum cisterns, Golgi complex hypertrophy, an increase in the number of immature secretory granules and vacuoles in the cytoplasm are revealed in B cells.

Key words: pancreas, impaired glucose tolerance, insulinocyte.

Введение

Каждая фундаментальная наука имеет свои методы исследования и свои способы познания объекта. Анатомия, изучая организм, системы органов, орган в целом, издавна имеет два уровня исследования: макро- и микроанатомический. Методические возможности современной морфологии позволяют достаточно точно оценить степень нарушения процессов жизнедеятельности и установить структурные преобразования в органе на всех уровнях его организации [4]. Несмотря на наличие достаточно обширных данных о цитологических особенностях эндокринных клеток (В-клеток) собак, в настоящее время инсулиноциты остаются наиболее важными объектами экспериментального блока исследований в клинической эндокринологии [3]. В большинстве случаев исследования панкреатических островков собак проводятся с использованием иммуноцитохимических и гистологических методов. Данные об исследованиях на ультраструктурном уровне немногочисленны.

Цель исследования – в экспериментальных условиях выявить ультраструктурные особенности организации В-клеток панкреа-

тического островка у животных с нормальной и нарушенной толерантностью к глюкозе.

Материал и методы исследования

Объект исследования – беспородные собаки-самцы в возрасте 2–4 лет. Животных содержали в виварии с соблюдением стандартного рациона питания. Исследования проводили в соответствии с приказами Минвуза СССР №742 от 13.11.84 г. «Об утверждении правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» и №48 от 23.01.85 г. «О контроле над проведением работ с использованием экспериментальных животных».

В ходе эксперимента проводилось типирование животных. Оценивали результаты стандартного теста толерантности к глюкозе и тощачный уровень глюкозы венозной крови на основе принятых критериев [10]. Утром натощак, после 10–14 часов голодания проводили тест в форме однократной углеводной нагрузки. После выполнения манипуляций по забору венозной крови животному давали сахар из расчета 1.75 г на 1 кг массы тела. Через 60 и 120 минут повторно определяли концентрацию глюкозы. Данные проведенных ана-

лизом выстраивали в виде гликемических кривых, в которых отображали начальное содержание, высоту подъема и конечный уровень глюкозы в крови. По результатам проведенных проб сформированы две группы животных: с нормальной толерантностью к глюкозе ($n=10$) и с нарушенной толерантностью к глюкозе – латентным сахарным диабетом – ($n=10$).

Резекцию поджелудочной железы проводили после рассечения передней брюшной стенки собаки под внутривенным тиопенталовым наркозом (0.5 мл 10% раствора тиопентала натрия на 1 кг массы животного). Выделенные кусочки железы фиксировали в 2.5% глутаровом альдегиде, затем дофиксировали 1% раствором четырехокси осмия с заливкой в эпон-аралдит. Идентификацию панкреатических островков с последующей прицельной заточкой с каждого блока выполняли на полутонких срезах, изготовленных на ультратоме Ultracut фирмы Reichert-jung, окрашенных метиленовым синим, основным фуксином. Цитратом свинца и уранилацетатом контрастировали ультратонкие срезы и изучали в электронном микроскопе Morgagni 268D фирмы FEI в трансмиссионном режиме с использованием программы Analysis.

Результаты и их обсуждение

На обзорных снимках ткани поджелудочной железы собак с нормальной толерантностью к глюкозе среди ацинусов экзокринной паренхимы отчетливо определяются панкреатические островки, состоящие из кластеров различных эндокринных клеток. В островках преобладают инсулинпродуцирующие В-клетки. Их число, в зависимости от размеров островка, значительно варьирует. Клетки располагаются, преимущественно, в центре островка, хотя строго определенной локализации не установлено. Инсулиноциты имеют полигональную или неправильную форму. Округлое, несколько удлиненное ядро клетки функционально активно. В нуклеоплазме преобладает эухроматин, равномерно распределенный по всему пространству ядра, хорошо различимы ядерные поры. Секреторные гранулы достаточно равномерно распределены по всей цитоплазме. Морфология гранул характерна для эндокринных клеток – центральное или несколько ассиметрично расположенное плотное «ядро» и светлый ободок «гало» между сердцевинкой и мембраной гранулы (рис. 1). Это пространство не является артефактом химической фиксации или обезвоживания образца в процессе его подготовки. Морфологические данные, полученные при использовании очень быстрой фиксации (криофиксация под повышенным давлением), подтвердили существование «гало» [1]. В клетках хорошо развит аппарат синтеза

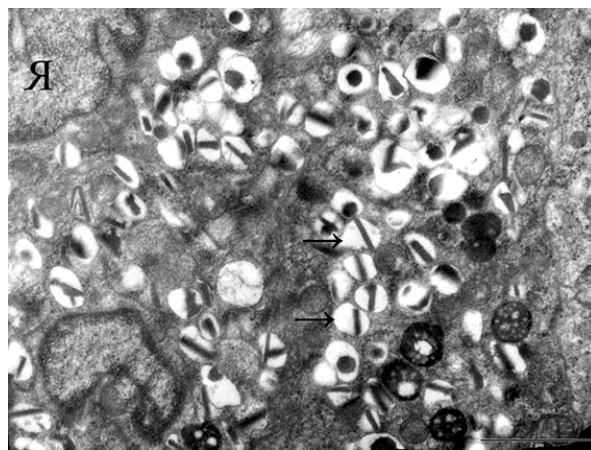


Рис. 1. Инсулиноцит панкреатического островка животных с нормальной толерантностью к глюкозе (Я – ядро, → – секреторные гранулы). Ув. 8900.

белка. На полисомах шероховатого эндоплазматического ретикулама происходит образование молекулы инсулина в неактивной форме в виде препроинсулина. Затем он быстро расщепляется до проинсулина. В течение энергозависимого процесса происходит перенос проинсулина в пластинчатый комплекс, где он упаковывается в микропузырьки с гладкой поверхностью. Микропузырьки обеспечивают его хранение и секрецию.

По данным Ф. Фелиг с соавт. (1985), с фазы попадания в пластинчатый комплекс, в секреторных гранулах мембранные протеазы расщепляют проинсулин на эквимолярные количества инсулина и С-пептида. Инсулин с цинком аккумулируются в центральном участке созревающей секреторной гранулы, набирающей все большую электронную плотность. С-пептид размещается в периферическом прозрачном пространстве секреторной гранулы. В настоящее время доказано, что сигнальная последовательность полипептидной цепи инсулина отрезается в гранулярной эндоплазматической цепи, в транс-Гольджисети боковые А- и В-цепи связываются двумя дисульфидными мостиками, а в образовавшихся секреторных вакуолях пептидаза вырезает центральный сегмент – С-пептид. В результате, в зрелых секреторных гранулах оказываются и димер инсулина, и вырезанные цепочки С-пептида [1].

Секреторные гранулы инсулиноцитов собак имеют видовую специфичность – кристаллоидная структура инсулина в центре гранул имеет вытянутую палочковидную форму [5]. Ряд исследователей высказывает предположение о разной степени созревания гранул, считая «палочковидные» гранулы зрелыми (содержащими инсулин, С-пептид и цинк), а гранулы с округлым «ядром» – молекулами проинсулина, который в определенных количествах выводится в кровеносное русло [6]. В связи с необходимостью поддержания должного уровня углеводного гомео-

стаза образование молекул инсулина в клетке и высвобождение гормона в кровь происходит постоянно, но с разной интенсивностью в зависимости от потребности организма. Секреция инсулина в норме характеризуется пульсацией в виде волн с интервалом 8–14 минут, что имеет значение для синхронизации работы В-клеток [8]. Большая часть инсулина секретируется в узкие межклеточные щели, в интерстиции гормон диффундирует к стенке капилляров, которые активно резорбируют интерстициальную жидкость, осуществляя транспорт гормона. Однако встречаются клетки, секреторная поверхность которых находится в близком контакте со стенкой фенестрированных капилляров, через которые осуществляется транспорт гормона. В разных инсулиноцитах в пределах одного островка в цитоплазме определяется неравномерное содержание секреторных гранул – в одних клетках цитоплазма полностью заполнена секреторным материалом, в других – гранулы большей частью сосредоточены вблизи клеточной поверхности. Полученные результаты позволяют сделать предположение о наличии фаз секреторной активности гормона в клетках, несмотря на конститутивный тип секреции.

Электронно-микроскопическое исследование инсулиноцитов панкреатических островков у собак с нарушенной толерантностью к глюкозе позволило выявить некоторые особенности структурной организации клеток, обусловленные повышенной потребностью гормона в организме. В-клетки пребывают в состоянии функционального напряжения, что характеризуется возрастанием размера ядра, преобладанием гетерохроматина в кариоплазме, сгруппированного в виде очагов в центре ядра и с внутренней поверхности кариолеммы. Цистерны эндоплазматического ретикулума расширены, содержат мало электронно-плотного материала, отмечается гиперплазия как связанных с мембранами, так и свободных рибосом, образующих полисомы. Комплекс Гольджи хорошо развит, увеличен. Цитоплазма насыщена секреторными гранулами различной степени созревания. Вблизи цис-Гольджи-поверхности сосредоточены мелкие гранулы с широким электронно-прозрачным «галом» вокруг плотной округлой части (рис. 2). Увеличивается количество гранул без осмиофильного содержимого. Полученные данные позволяют говорить о постоянной нерегулируемой секреции гормона. Фазы накопления или выведения инсулина, в отличие от В-клеток у животных с нормальной толерантностью к глюкозе, не выражены.

По данным И.И. Дедова, Г.А. Мельниченко, В.В. Фадеева (2007), в норме в ответ на стимул (сахарную нагрузку) тип секреции В-клеток становится регулируемым. Первичный быстрый «всплеск» секреции возникает в

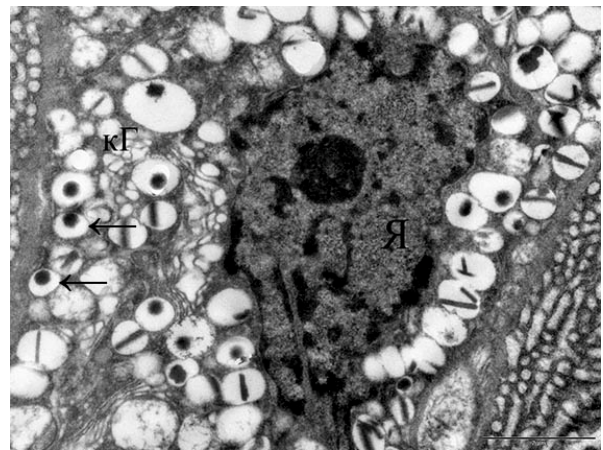


Рис. 2. Инсулиноцит панкреатического островка животных с нарушенной толерантностью к глюкозе (Я – ядро, → – незрелые секреторные гранулы). Ув. 8900.

пределах 1-й минуты после поступления глюкозы, достигая максимального значения в пределах 2-х минут и снижаясь в последующие 3–5 минут. Вторая фаза, которая характеризуется более плавным, но стабильным ростом уровня инсулина, начинается спустя 5–10 минут после начала нагрузки и продолжается на протяжении следующего часа. В первую фазу секреции происходит быстрое опустошение остро высвобождаемого пула, содержащего ранее синтезированный инсулин. Во вторую фазу наблюдается постепенное опустошение второго, хронически высвобождаемого пула, содержащего вновь синтезируемый инсулин и небольшие количества проинсулина, пополняющие запасы преформированного инсулина.

При нарушенной толерантности к глюкозе В-эндокриноциты панкреатических островков постоянно функционируют с усиленной нагрузкой. Ранняя фаза прандиального инсулинового ответа замедлена и сглажена, так как отсутствует запас свободного инсулина для экстренного выброса в кровь, пульсация секреции иссякает, выработка инсулина перманентная [11].

Заключение

Проведенное исследование показало, что ультраструктурные изменения формируются в В-клетках уже в доклинической стадии развития латентного сахарного диабета, когда симптоматические проявления недостаточности усвоения глюкозы практически отсутствуют. Поэтому метод электронной микроскопии может быть успешно использован для анализа клинически неявных патогенетических проявлений, так как позволяет «обнаружить» не только морфологические изменения, свойственные развернутой картине того или иного заболевания, но и начальные изменения при болезнях, клинические проявления которых еще отсутствуют в силу состоятельно-

сти компенсаторно-приспособительных процессов» [7].

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

1. Банин В. В. Цитология. Функциональная ультраструктура клетки. Атлас : учебное пособие. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2016. 264.
2. Дедов И. И., Мельниченко Г. А., Фадеев В. В. Эндокринология. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2007. 268–270.
3. Иванова В. Ф., Пузырев А. А. Структурно-функциональные изменения в поджелудочной железе белой крысы при введении глюкозы. Морфология. 2006; 129(1): С. 67–71.
4. Молдавская А. А., Горбунов А. В., Калаев А. А., Жабина А. В., Серебряков А. А., Болдырев Д. В., Кондратьев А. С. Современные методы исследования эмбриона человека. Вестник Тамбовского университета. Серия: Естественные и технические науки. 2014; 19(1): 87–89.
5. Никонова Л. Г. Структурно-функциональные особенности элементов поджелудочной железы у животных с различной толерантностью к глюкозе. Медицинский альманах. 2011; 5: 160–164.
6. Пузырев А. А., Иванова В. Ф., Костюкевич С. В. Ультраструктура эндокринных клеток поджелудочной железы собаки. Морфология. 2006; 130(6): 68–72.
7. Саркисов Д. С. Очерки по структурным основам гомеостаза. М.: Медицина; 1977. 351.
8. Смирнова О. М., Кононенко И. В. Значение комплексного контроля гликемии при сахарном диабете 2-го типа. Проблемы эндокринологии. 2010; 56(5): 43–51.
9. Фелиг Ф., Бакстер Дж., Бродус А. Е., Фроммен Л. А. Эндокринология и метаболизм. Перевод с англ. М.: Медицина; 1985. 452.
10. American Diabetes Association. Diabetes and classification of diabetes mellitus. Diabetes care. 2004; 27(1): 15–110.
11. De Fronzo R. A., Tobin J. D., Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. Am J Physiology. 2003; 11: 214–233.
12. zheleze beloi krysy pri vvedenii glyukozy [Structure-functional changes in rat pancreas after glucose injection]. Morfologiya. 2006; 129(1): С. 67–71 (in Russian).
13. Moldavskaya A.A., Gorbunov A.V., Kalaev A.A., Zhabina A.V., Serebryakov A.A., Boldyrev D.V., Kondrat'ev A.S. Sovremennye metody issledovaniya embriona cheloveka [Modern research methods of human embryo]. Bulletin of Tambov University. Series: Natural and technical Sciences. 2014; 19(1): 87–89 (in Russian).
14. Nikonova L.G. Strukturno-funktsional'nye osobennosti elementov podzheludochnoi zhelezy u zhivotnykh s razlichnoi tolerantnost'yu k glyukoze [Structural-functional peculiarities of elements of pancreas of animals with different tolerance to glucose]. Medical Almanac. 2011; 5: 160–164 (in Russian).
15. Puzyrev A.A., Ivanova V.F., Kostyukevich S.V. Ul'trastruktura endokrinnnykh kletok podzheludochnoi zhelezy sobaki [The ultrastructure of endocrine cells in dog pancreas]. Morfologiya. 2006; 130(6): 68–72 (in Russian).
16. Sarkisov D.S. Ocherki po strukturnym osnovam gomeostaza [Essays on the structural foundations of homeostasis]. Moscow: Meditsina; 1977. 351 (in Russian).
17. Smirnova O.M., Kononenko I.V. Znachenie kompleksnogo kontrolya glikemii pri sakharnom diabete 2-go tipa [The importance of combined glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus]. Problems of Endocrinology. 2010; 56(5): 43–51 (in Russian).
18. Felig F., Bakster Dzh., Brodus A.E., Fromen L.A. Endokrinologiya i metabolism. Perevod s angl [Endocrinology and metabolism]. Moscow: Meditsina; 1985. 452 (in Russian).
19. American Diabetes Association. Diabetes and classification of diabetes mellitus. Diabetes care. 2004; 27(1): 15–110.
20. De Fronzo R.A., Tobin J.D., Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. Am J Physiology. 2003; 11: 214–233.

Сведения об авторах

Никонова Лариса Геннадьевна – д-р мед. наук, доцент кафедры нормальной анатомии ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России. 603005, г. Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского. д.10/1 E-mail: Nikonessa@inbox.ru

Банин Виктор Васильевич – д-р мед. наук, профессор, чл.-корр. РАН, зав. кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, 105275, Москва, ул.Б. Жигуленкова, д. 23 E-mail: histologymgmsu@mail.ru

Степникова Ирина Геннадьевна – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой нормальной анатомии ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России. 603005, г. Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского. д.10/1. e-mail i.g.stelnikova@gmail.ru

Поступила в редакцию 21.07.2018 г.

Для цитирования: Никонова Л.Г., Банин В.В., Степникова И.Г. Использование метода электронной микроскопии для выявления и анализа клинически неявных патогенетических проявлений. Журнал анатомии и гистопатологии. 2018; 7(3): 113–116. doi: 10.18499/2225-7357-2018-7-3-113-116.

For citation: Nikonova L.G., Banin V.V., Stelnikova I.G. Using of the method of electron microscopy for the identification and analysis of clinically implicit pathogenetic manifestations. Journal of Anatomy and Histopathology. 2018; 7(3): 113–116. doi: 10.18499/2225-7357-2018-7-3-113-116.