

Н. М. Кононенко, М. С. Анісімова

Національний фармацевтичний університет Міністерства охорони здоров'я України

Вплив нової фітокомпозиції на основі екстракту з листя журавлини великоплідної та амінокислот на стан підшлункової залози й печінки щурів на моделі цукрового діабету 2 типу

У фармакотерапії цукрового діабету 2 типу (ЦД2) та метаболічного синдрому для корекції порушень, які розвиваються на тлі інсулінорезистентності, як важливе профілактичне і лікувальне доповнення застосовують лікарські рослини й амінокислоти, що зумовлює актуальність розробки нових вітчизняних комбінованих антидіабетичних фітопрепаратів.

Мета дослідження – вивчити вплив фітокомпозиції на основі поліфенольного екстракту з листя журавлини великоплідної та амінокислот (L-аргінін, таурин, гліцин) на стан печінки й підшлункової залози щурів в умовах експериментальної моделі ЦД2.

Матеріали та методи. Цукровий діабет 2 типу відтворювали шляхом введення щурам розчину стрептозотоцину 65 мг/кг внутрішньочеревно, одноразово, з попереднім (за 15 хв) введенням нікотинамід у інтраперитоніально 230 мг/кг на тлі ожиріння (утримували щурів на висококалорійній дієті впродовж 12-ти тижнів). Панкреато- та гепатопротекторну властивості досліджуваної фітокомпозиції вивчали за морфофункціональним станом β -клітин підшлункової залози, вмістом глікогену й нейтральних жирів у печінці та морфометричними показниками в підшлунковій залозі.

Результати та їх обговорення. Досліджувана фітокомпозиція виявила стимулювальний вплив на регенераційні процеси в інсулінпродукувальному апараті підшлункової залози щурів: виразність проліферації малих β -клітин у панкреатичних острівцях значно зростала, якщо порівнювати з контрольною патологією.

На морфологічному рівні фітокомпозиція виявила гепатопротекторні властивості, значно зменшуючи прояви токсико-дистрофічної дії діабетогенів та відновлюючи жировий і вуглеводний обмін у гепатоцитах.

Висновки. Отримані результати обґрунтовують доцільність подальшого вивчення фітокомпозиції як перспективного протидіабетичного засобу.

Ключові слова: цукровий діабет 2 типу; стрептозотоцин; нікотинамід; підшлункова залоза; печінка; журавлина великоплідна; амінокислоти

N. M. Kononenko, M. S. Anisimova

National University of Pharmacy of the Ministry of Health of Ukraine

The effect of a new phytocomposition based on the cranberry leaf extract and amino acids on the pancreas and liver of rats in the model of diabetes mellitus type 2

In pharmacotherapy of diabetes mellitus type 2 and metabolic syndrome, medicinal plants and amino acids are used as an important preventive and therapeutic supplement to correct disorders that develop against the background of insulin resistance, which determines the relevance of developing new domestic combined antidiabetic herbal medicines.

Aim. To study the effect of a phytocomposition based on the polyphenol extract from large-fruited cranberry leaves and amino acids (L-arginine, taurine, glycine) on the state of the liver and pancreas of rats in an experimental model of diabetes mellitus type 2.

Materials and methods. Diabetes mellitus type 2 was reproduced by a single injection of rats with a streptozotocin solution in the dose of 65 mg/kg, intraperitoneally with the previous (15 min) intraperitoneal administration of nicotinamide in the dose of 230 mg/kg against the background of obesity (keeping rats on a high-calorie diet for 12 weeks). The pancreatic and hepatoprotective effect of the phytocomposition was studied according to the morphofunctional state of pancreatic β -cells, the content of glycogen and neutral fats in the liver and morphometric indices in the pancreas.

Results. The phytocomposition studied had a stimulating effect on regenerative processes in the insulin-producing apparatus of the rat pancreas – the severity of proliferation of small β -cells in pancreatic islets significantly increased compared to the control pathology. The phytocomposition at the morphological level showed hepatoprotective properties considerably reducing the manifestations of the toxic-dystrophic action of diabetogens, significantly restoring fat and carbohydrate metabolism in hepatocytes.

Conclusions. The results obtained substantiate the feasibility of further study of the phytocomposition as a promising antidiabetic agent.

Key words: diabetes mellitus type 2; streptozotocin; nicotinamide; pancreas; liver; large-fruited cranberry; amino acids

Вступ. Цукровий діабет (ЦД) у всіх його формах – це проблема глобального рівня, яка є людським і соціально-економічним тягарем для будь-якої країни світу незалежно від рівня її економічного розвитку та доходів населення. Прогнозують, що до 2030 р. кількість хворих на діабет збільшиться до 552 млн (9,9 % або один хворий на ЦД на 10 здорових дорослих), а до 2035 р. – до 592 млн (10,1 %) [1]. За даними Міжнародної діабетичної федерації, є ще додатково 50 % від загальної кількості випадків ЦД – до 183 млн осіб, які вже хворі, проте ще не діагностовані [2].

Цукровий діабет 2-го типу (ЦД2) – це порушення вуглеводного обміну, спричинене переважною інсулінорезистентністю та відносною інсуліновою недостатністю або з переважним дефектом секреції інсуліну з інсулінорезистентністю. Зростання захворюваності дозволяє говорити про епідемію ЦД [3].

За даними сайту «Атлас : Діабет в Україні» [4], поширеність ЦД серед населення нашої країни 2017 року складала 3,0 % (42584542 – кількість населення України, хворих на ЦД – 1270929 осіб). Дані наведено без урахування хворих на ЦД на окупованих територіях Донецької, Луганської областей та АР Крим.

Для України нині додався ще один фактор ризику ЦД – війна і постійний стан стресу, який вона викликала.

Зазначене доводить наявність сталої тенденції до зростання захворюваності на ЦД2 серед населення України вже зараз і найближчим часом. Це дозволяє констатувати, що питання лікування ЦД стає важливим чинником впливу як на стан здоров'я населення, так і на діяльність національної системи охорони здоров'я і сфери охорони здоров'я загалом.

Варто зауважити, що сучасні пероральні гіпоглікемічні засоби викликають побічні реакції [5], а їх застосування не завжди дозволяє досягти цільових показників глікемії, що свідчить про актуальність пошуку й дослідження нових перспективних антидіабетичних препаратів [6].

У цьому аспекті у фармакотерапії ЦД2 як важливе профілактичне та лікувальне доповнення застосовують лікарські рослини, що мають широкий спектр фармакологічної дії.

Перспективною рослинною сировиною, яку можна використати для розробки антидіабетичних засобів, є *Vaccinium macrocarpon* (журавлина великоплідна) – рослина родини Вересових (Ericaceae). Вибір листя журавлини великоплідної як сировини для одержання поліфенольного екстракту обґрунтовано значним вмістом у ньому фенольних сполук, що відповідають за гіпоглікемічну активність, зумовлену наявністю простих фенолів (арбутин); флавоноїдів, які покращують мікроциркуляцію тканин за рахунок мембраностабілізуювальної та антиоксидантної дії; аскорбінової кислоти; гідроксикоричних кислот, зокрема галової та хлорогенової кислоти, що здатна інгібувати глюкозо-6-фосфатазу. Цей фермент каталізує кінцевий етап глікогенолізу та глікогеногенезу. Актуальним також є можливе посилення гіпоглікемічної

активності в разі модифікації екстракту журавлини великоплідної листя амінокислотами, вплив яких на метаболічні процеси на тлі інсулінорезистентності обґрунтовано даними літератури [7, 8].

У Національному фармацевтичному університеті розроблено поліфенольний екстракт із листя журавлини великоплідної з додаванням амінокислот.

Метою роботи було вивчити вплив фітокомпозиції на основі поліфенольного екстракту з листя журавлини великоплідної та амінокислот (L-аргінін, таурин, гліцин) на стан печінки й підшлункової залози щурів в умовах експериментальної моделі ЦД2.

Матеріали та методи. Експерименти виконано на 30 статевозрілих інбредних щурах-самцях масою 180 ± 20 г, що їх утримували в стандартних умовах віварію Навчально-наукового інституту прикладної фармації НФаУ. Усі маніпуляції здійснювали з дотриманням принципів біоетики відповідно до положення Європейської конвенції про захист хребетних тварин, використовуваних для дослідних та інших наукових цілей (European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes, Страсбург, 1986), Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (від 15.12.2009 р. № 1759-VI) та Директиви Європейського Союзу 2010/10/63 EU щодо експериментів на тваринах [9-11].

Сухий спиртовий екстракт з листя журавлини великоплідної з додаванням амінокислот отримано на кафедрі фармакогнозії Національного фармацевтичного університету під керівництвом професора О. М. Кошового. Екстрагент для одержання екстракту вибирали експериментальним шляхом. З'ясували, що використання 50 % спирту у співвідношенні 1:10 (з урахуванням коефіцієнта поглинання екстрагента) забезпечує найбільший вихід сухого екстракту з листя журавлини великоплідної, кількісний вміст гідроксикоричних кислот (12,23 %) та флавоноїдів (4,01 %), які і відповідають за гіпоглікемічну дію. Зазначене співвідношення є достатнім для одержання засобу для корекції інсулінорезистентних станів та оптимальним у технологічному плані для одержання заявленого засобу в промислових умовах і раціонального використання спирту. Листя журавлини великоплідної подрібнювали до розміру частинок 1-3 мм та тричі екстрагували 50 % розчином спирту етилового в загальному співвідношенні 1:10 за кімнатної температури протягом доби. Витяжки об'єднували, відстоювали протягом доби за кімнатної температури, відокремлювали надосадову рідину фільтруванням, після чого додавали аргінін, таурин і гліцин у триразовій еквімолярній кількості щодо загальної суми фенольних сполук в екстракті, настоювали добу й упарювали до сухого екстракту.

В одержаному сухому екстракті з листя журавлини великоплідної міститься не менше 10 % фенольних сполук у перерахунку на галову кислоту, не менше 5 % гідроксикоричних кислот у перерахунку на хлорогенову кислоту та не менше 2 % флавоноїдів у перерахунку на рутин.

Як референтні препарати обрали збір «Арфазетин» (ЗАТ «Ліктрави», Україна) та таблетки «Метформін» (KRKA, Slovenia; Teva Pharmaceutical Industries Ltd, Poland). Збір «Арфазетин» обрали тому, що це єдиний препарат рослинного походження з протидіабетичною активністю, присутній наразі на фармацевтичному ринку України. До складу збору входять пагінці чорниці (20 %), лушпинки плодів квасолі звичайної (20 %), кореневище з корінням ехінопанаксу високого (заманихи) (15 %), плоди шипшини (15 %), трава хвощу польового (10 %), трава звіробою (10 %), квітки ромашки (10 %). Таблетки «Метформін» застосовували внутрішньошлунково в дозі 60 мг/кг маси щурів, що її обчислили з середньої добової дози для людини (2000 мг/день) за допомогою коефіцієнтів перерахунку, беручи до уваги площу тіла тварини.

Фітозбір «Арфазетин» застосовували у вигляді настою, який готували за інструкцією: 5 г збору заливали 200 мл гарячою кип'яченою водою і настоювали на киплячій водяній бані 15 хв із закритою кришкою. Далі охолоджували за кімнатної температури протягом 45 хв, проціджували й доводили до первинного об'єму 200 мл кип'яченою водою. Дозу фітопрепарату добирали, спираючись на рекомендації з дозування настоек та інструкцію до медичного застосування препарату (середня терапевтична доза для людини масою тіла 70 кг складає 300 мл настою на добу: $300 \text{ мл}/70 \text{ кг} = 4,3 \text{ мл/кг}$, отже, з огляду на коефіцієнт видової чутливості доза для тварин складає: $4,3 \text{ мл/кг} - 0,45$; $X \text{ мл/кг} - 1,89$; $X = 18 \text{ мл/кг}$ настою на добу).

ЦДЦ моделювали за методикою Islam S., Choi H. [12] шляхом введення щурам розчину стрептозотоцину (STZ, «Sigma», США) 65 мг/кг, внутрішньочеревно, одноразово, з попереднім (за 15 хв) введенням нікотинамиду (N, «Sigma – Aldrich», США) інтраперитоніально 230 мг/кг на тлі ожиріння. До цього щури протягом 12-ти тижнів перебували на висококалорійній дієті (ВКД) (дієта з надмірним вмістом насичених жирів: білки – 20,0 %, жири – 60,0 %, вуглеводи – 20,0 % від загального калоражу). Стрептозоточин розчиняли *ex tempore* і вводили на цитратному буфері (рН 4,5), зважаючи на той факт, що в лужному та нейтральному середовищі він швидко деградує до неактивних метаболітів і втрачає свою діабетогенну активність.

Тварин шляхом сліпої вибірки було рандомізовано в такі групи (n = 6): 1 – інтактний контроль (ІК), тварини отримували відповідну кількість цитратного буфера (рН 4,5) внутрішньошлунково через зонд; 2 – щури з контрольною патологією (КП); 3 – щури, які на тлі стрептозотоцину з попереднім введенням нікотинамиду одержували фітокомпозицію в дозі 100 мг/кг внутрішньошлунково (ФК); 4 та 5 групи – тварини, яким на тлі діабету вводили препарати порівняння.

Досліджувану фітокомпозицію і референс-препарати вводили один раз на день протягом 28-ми діб.

Перше введення засобів починали через 24 години після індукції діабету.

Виводили всіх тварин з експерименту на 30-й день після індукції діабету шляхом передозування ефірного наркозу. Комісія з питань біоетики НФаУ не виявила порушень морально-етичних норм під час планування та проведення досліджень (№ 7 від 20.10.2022 р.). Зразки печінки й підшлункової залози (тіло та хвостову частину) вилучали з товщі шлунково-селезінкової зв'язки, фіксували в 10 % розчині формаліну, заливали парафіном. Зрізи фарбували гематоксилином та еозином. Ідентифікували β -клітини острівцевого апарату підшлункової залози після фарбування зрізів альдегід-фуксином за Гоморі, що забарвлює базofilні гранули інсуліну в цитоплазмі клітин у синьо-фіолетовий колір. Застосування цього методу дозволяє визначати наявність клітин в острівцях Лангерганса, де відбувається синтез інсуліну, а також оцінити функціональний стан β -клітин.

На зрізах печінки проводили також ШИК-реакцію за Мак-Манусом для виявлення глікогену (контроль з амілазою слини). Для верифікації нейтральних жирів окремі зразки печінки після фіксації у формаліні різали на мікротомі, що заморожує, зрізи фарбували суданом IV [13].

Виконували морфометричні виміри: на зрізах підшлункової залози (фарбування гематоксилином і еозином) визначали оптичну щільність панкреатичних острівців (ПО) (загальну кількість їх у мікропрепараті) та острівцевий профіль (кількість β -клітин у острівці). За показником острівцевого профілю розподіляли острівці на дрібні (до 20 β -клітин), середні (21-60 β -клітин) та великі (> 61 β -клітини), визначали частку кожної категорії ПО [14]. За виразністю фарбування альдегід-фуксином і характером розподілу базofilних гранул інсуліну в цитоплазмі інсуліноцитів оцінювали морфофункціональний стан β -клітин у ПО за 4-х бальною системою [15]: 4 бали – майже всі β -клітини рівномірно заповнені виразно пофарбованими альдегід-фуксином гранулами; 3 бали – значна кількість β -клітин містить помірно пофарбовані альдегід-фуксином гранули; 2 бали – одні β -клітини заповнені помірно пофарбованими альдегід-фуксином гранулами, інші – повністю їх позбавлені; 1 бал – клітини з мінімальною кількістю помірно чи слабо пофарбованими альдегід-фуксином гранулами. Всі отримані цифрові дані обробляли методами варіаційної статистики.

Мікропрепарати переглядали під світловим мікроскопом Granum, мікроскопічні зображення фотографували цифровою відеокамерою Granum DCM 310. Фотознімки обробляли на комп'ютері Pentium 2,4GHz за допомогою програми Tour View.

Результати та їх обговорення. У щурів з групи ІК залозиста тканина підшлункової залози складалася з помірних за розміром часточок, у яких містилися кінцеві відділи альвеолярної залози – ациноси (екзокринна частина) та панкреатичні острівці (ендокринна частина). ПО округло-овальної форми,

чітко відокремлені від навколишньої ацинарної паренхіми. Центральна частина острівців доволі щільно й рівномірно заповнена β -клітинами, розташованими тяжами, які розподілялися синусоїдальними капілярами. По периферії острівців ланцюжком одна до одної розміщені α -клітини. Такий зональний розподіл розташування α - і β -клітин в острівці є типовим для досліджуваного виду тварин. Після фарбування альдегід-фуксином цитоплазма β -клітин рівномірно забарвлена в синьо-фіолетовий колір, що свідчить про нормальний рівень їхньої функціональної активності.

У результаті морфометричних досліджень з'ясували, що оптична щільність ПО дорівнювала 22 одиницям. За острівцевим профілем розподілили їх так:

дрібні – 28,2 %, середні – 60 %, великі – 11,8 %. Інтенсивність фарбування альдегід-фуксином інсуліноцитів у острівцях була на рівні 3,3 бала (табл.).

Ацинуси щільно розташовані, чітко відокремлені один від одного, склалися з одного шару залозистих клітин. Цитоплазма екзокринних панкреатитів мала базofilьну периферичну зону, що містила ядро, та оксифільну центральну зону, що містила зерна зимогену. Співвідношення цих зон коливалося в межах 1:1,5 – 1:2, що відображає нормальний асинхронний характер функціональної активності клітин. Міжчасточкові сполучнотканинні прошарки вузькі. Внутрішньочасточкові та міжчасточкові вивідні протоки, артерії та вени різних калібрів зорво не змінені (рис. 1).

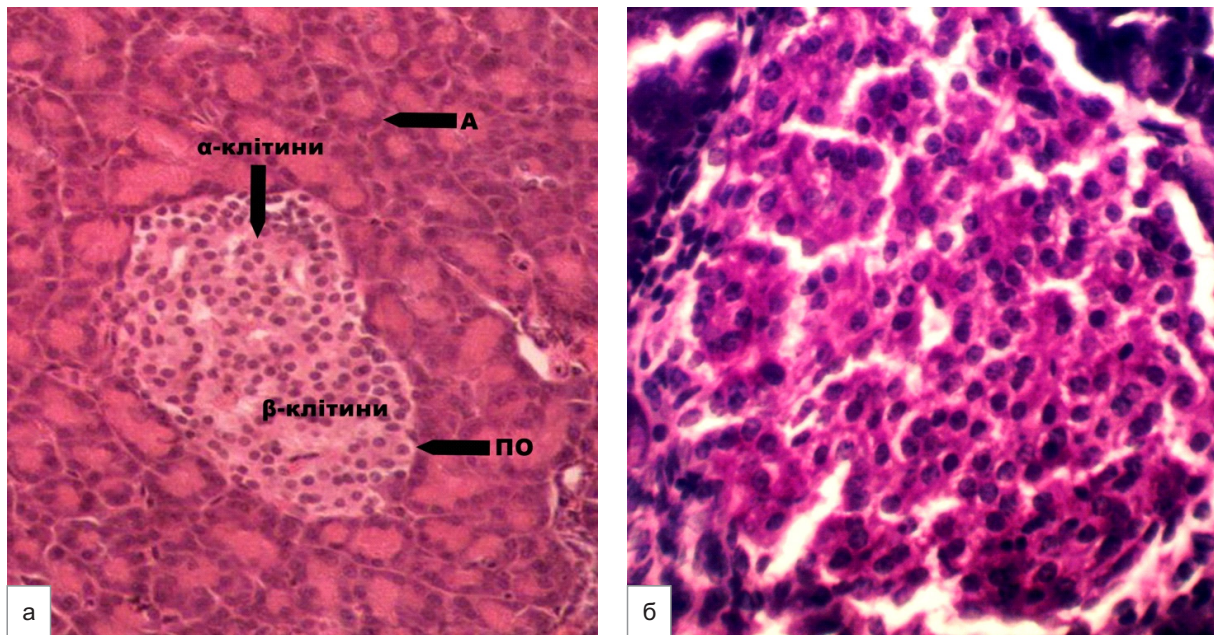


Рис. 1. Підшлункова залоза інтактного щура: а) – нормальний стан ацинусів (А) та клітин ПО (гематоксилін-еозин, х250); б) – інтенсивне рівномірне забарвлення цитоплазми β -клітин (альдегід-фуксин за Гоморі-гематоксилін, х400)

Таблиця

Вплив ФК та препаратів порівняння на морфометричні показники підшлункової залози щурів в умовах ЦД2, (n 0 = 6)

| Група | Оптична щільність ПО (кількість у мікропрепараті) | Розмір ПО (за кількістю β -клітин) | | | Виразність альдегід-фуксинофільної забарвленості β -клітин ПО (бали) |
|-----------|---|--|---|--|--|
| | | Дрібні (до 20), % | Середні (21-60), % | Великі (> 60), % | |
| ІК | 22,0 ± 0,37 [21; 23] 100 % | 6,17 ± 0,48 [4; 7] 28,2 % | 13,2 ± 0,31 [12; 14] 60 % | 2,67 ± 0,21 [2; 3] 11,8 % | 3,33 ± 0,21 [3; 4] |
| КП | 10,3 ± 0,49* [9; 12] 100 % | 12,5 ± 0,43* [11; 14] 56,6 % | 3,33 ± 0,21* [3; 4] 32,08 % | 1,0 ± 0,37 [0; 2] 11,32 % | 1,5 ± 0,22* [1; 2] |
| ФК | 17,5 ± 0,43*/# [16; 19] 100 % | 6,67 ± 0,21 ^{#/a/mm} [6; 7] 38 % | 9,67 ± 0,21 ^{*/#/m} [9; 10] 55,1 % | 1,17 ± 0,17 ^a [1; 2] 6,9 % | 3,0 ± 0,0 ^{#/aa/m} [3; 3] |
| Арфазетин | 16,8 ± 0,60*/# [15; 19] 100 % | 5,67 ± 0,33 [#] [5; 7] 34,11 % | 8,67 ± 0,49*/# [8; 11] 51,76 % | 2,33 ± 0,42 ^{###} [1; 4] 14,13 % | 2,33 ± 0,21 ^{*/###} [2; 3] |
| Метформін | 17,0 ± 0,37*/# [16; 18] 100 % | 5,5 ± 0,22 [#] [5; 6] 32,95 % | 10,5 ± 0,22 ^{*/#/aa} [10; 11] 60,23 % | 1,17 ± 0,31 ^a [0; 2] 6,82 % | 2,5 ± 0,22 ^{***/#} [2; 3] |

Примітка. Достовірні відмінності: з групою інтактного контролю – *p < 0,001, **p < 0,01, ***p < 0,05; з групою контрольної патології – #p < 0,001, ##p < 0,01, ###p < 0,05; з групою Арфазетину – ^ap < 0,05, ^{aa}p < 0,01; з групою Метформіну – ^mp < 0,05, ^{mm}p < 0,01.

Гістологічна картина печінки інтактних щурів мала типову для цих тварин будову. Часточковий малюнок тканини змазаний унаслідок майже повної відсутності сполучнотканинних міжчасточкових прошарків. Межі часточок визначали за триадами. Зони триад (портальних трактів) вузькі. Гепатоцити в часточках розташовані тяжами, що мали чітку радіальну спрямованість. Клітини зберігали характерні форму та розмір, цитоплазма рівномірно профарбована, оптично щільна, не містила вкраплень, яких було б видно за світлової мікроскопії. Ядра гепатоцитів нормохромні, центрально розміщені, містили 1, рідше 2 ядерця. Кількість двоядерних гепатоцитів достатня. Внутрішньочасточкові гемокапіляри помірно розширені, містили звичайну кількість лімфоїдних клітин. Зоряні ретикулоендотеліоцити (клітини Купфера) без особливостей, мітозів у клітинах не спостерігали. Стан епітелію жовчних протоків, ендотелію термінальних гілок кровоносних судин у триадах, а також ендотелію інших кровоносних судин у межах норми. ШИК-реакція засвідчила, що цитоплазма гепатоцитів рівномірно та щільно заповнена дрібними гранулами глікогену, фарбування суданом не виявило накопичення жиру в клітинах (рис. 2).

Після введення стрептозотоцину і нікотинамід у тлі попередньої довготривалої ВКД інсулярний апарат щурів зазнав значних змін. У візуально нечисленних ПО видно різного ступеня виразності вакуолізацію β -клітин. Часто спостерігали нерівномірне спустошення центральних ділянок острівців. Частина ядер інсуліноцитів гіпертрофована, деформована. Спостерігали й тотально зруйновані ПО. У деяких ПО видно вогнищеву проліферацію α -клітин у місцях типової їх локалізації. У поодиноких острівцях у спустошених центральних зонах були дуже дрібні групки клітин з невеликим темним компактним ядром та вузькою смужкою цитоплазми. Фарбування альдегід-фуксином засвідчило достатньо виразне зменшення, нерівномірність забарвленості цитоплазми або відсутність її у більшості β -клітин (рис. 3). Межа між ПО і навколишньою ацинарною паренхімою іноді не чітка. Морфометрично об'ємна щільність острівців проти ІК знизилася у 2,1 раза ($p < 0,001$). Перевагу мали дрібні острівці. Частка їх збільшилась у 2 рази ($p < 0,01$). Частка середніх ПО зменшилась у 3,96 рази ($p < 0,001$). Середня інтенсивність фарбування альдегід-фуксином β -клітин у острівцях становила 1,5 бала ($p < 0,001$) (табл.).

Змін структурної організації екзокринної складової підшлункової залози щурів не виявили. Помітили лише вогнищеву більш виразну асинхронність функціональної активності екзокринних панкреатитів (коливання співвідношення базофільної та оксифільної зон у цитоплазмі клітин частини ацинусів було в межах від 1:0,25-0,5 до 1:3 та більше). У деяких тварин місцями виявили перидуктальну круглоклітинну інфільтрацію.

У печінці щурів групи КП спостерігали різної виразності дифузні дистрофічні та некробіотичні зміни гепатоцитів. Цитоплазма гепатоцитів містила вакуолі та світлі, з нечіткими абрисами зони, набрякла. Місцям видно зони дисконкомплексії печінкових балок з дрібними осередками крововиливів. У деяких клітинах ядра не пофарбовані, лізовані. Візуалізовано збільшення гепатоцитів з деформованими ядрами. Доволі часто спостерігали апоптозно змінені гепатоцити у вигляді так званих тілець Каусильмена (рис. 4). Центральні вени та частина судин портальних трактів застійно повнокровні. Синусоїдальні капіляри часто не прозиралися. Портальні тракти розширені, інфільтровані лімфо-гістіоцитарними елементами. Наявність двоядерних клітин зорозово зменшена. Унаслідок ШИК-реакції виявили виразне зменшення інтенсивності фарбування цитоплазми гепатоцитів (зменшення глікогену), а після фарбування суданом – накопичення жирових крапель (рис. 5).

Наведена мікроскопічна картина є морфологічним відображенням токсико-дистрофічних змін з порушенням жирового, вуглеводного та білкового обміну [16].

Введення щурам з експериментальним ЦД2 досліджуваної фітокомпозиції позитивно вплинуло на стан ПО. У більшості ПО β -клітини візуально зберігали морфологічно нормальний вигляд, без ознак дистрофії та дегенерації. Клітини рівномірно заповнювали острівцеві, зберігаючи типове розташування тяжами. Обмежена і кількість острівців з проліферацією α -клітин у типових місцях їх розташування. Проліферація клітин з дрібними темними ядрами та вузькою смужкою цитоплазми виражена в частині острівців у помітно більшому ступені, ніж у КП. Лише в невеликій кількості ПО видно помірну вакуолізацію β -клітин, гніздове розрідження у їх розташуванні. Цілоком спустошених ПО не спостерігали. Фарбування альдегід-фуксином засвідчило, що в помітній частині β -клітин острівців відновлено достатньо

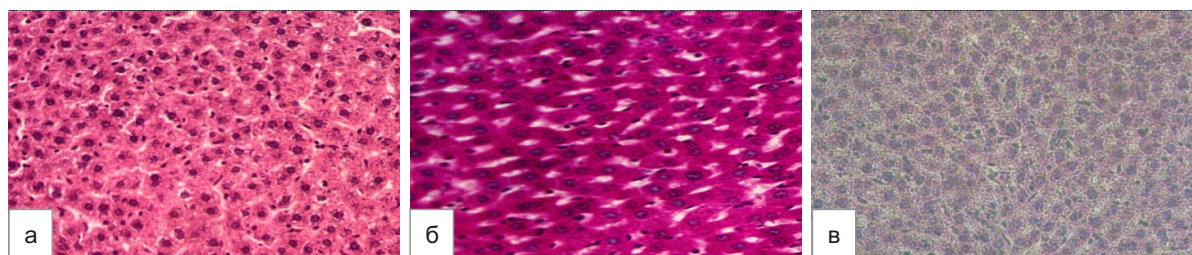


Рис. 2. Печінка інтактного щура: а) – нормальний балковий малюнок гепатоцитів (гематоксилін-еозин); б) – рівномірний розподіл гранул глікогену в цитоплазмі клітин (ШИК-реакція за Мак-Манусом); в) – відсутність жиру в цитоплазмі гепатоцитів (судан IV), x250

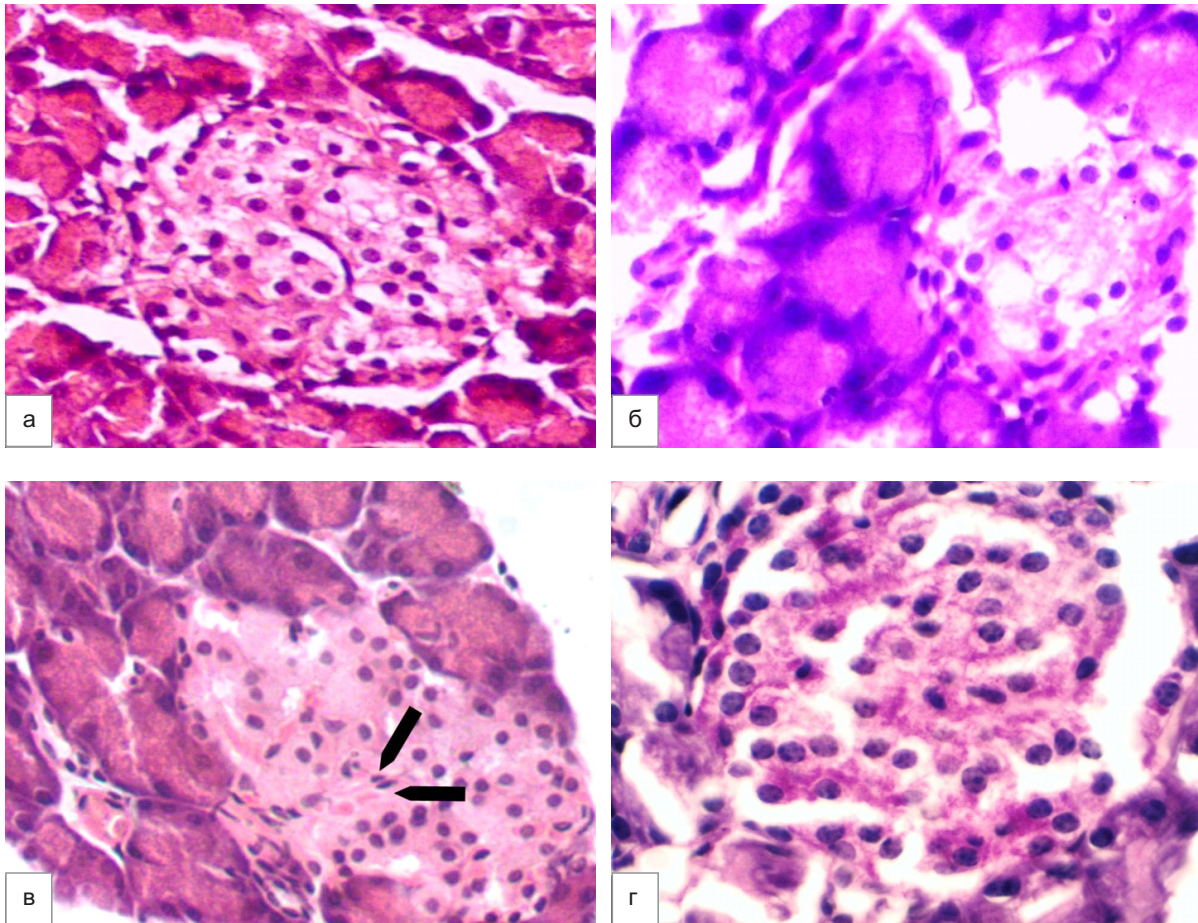


Рис. 3. Підшлункова залоза щура після введення стрептозотоцину з нікотинамідом на тлі попередньої довготривалої ВКД: а) – вакуолізація β -клітин в острівці; б) – спустошення β -клітин в острівці; в) – дуже дрібні групи клітин з невеликим темним компактним ядром та вузькою смужкою цитоплазми; г) – зменшення інтенсивності альдегід-фуксинофільного фарбування β -клітин острівця; а-в) – гематоксилін-еозин, $\times 250$; г) – альдегід-фуксин за Гоморі-гематоксилін, $\times 400$

рівномірне виразне забарвлення цитоплазми, хоча ще в певній частині клітин вона слабо забарвлена (рис. 6).

Морфометрично збільшилась на 70 % ($p < 0,001$) оптична щільність ПО проти контрольної патології. Частка дрібних ПО зменшилась на 46,46 % ($p < 0,01$), а середніх ПО збільшилась у 2,9 раза ($p < 0,001$) (табл.). Виразність фарбування альдегід-фуксином становила 3 бали ($p < 0,001$) (табл.).

Помітних змін у стані екскреторної складової залозистої паренхіми не виявили.

Спостерігали позитивний вплив фітокомпозиції і на гістологічний стан печінки щурів. Радіальний балковий малюнок гепатоцитів не змінений. Не візуалізувалися цитоліз та каріолізис, прояви апоптозу. Цитоплазма клітин рівномірно забарвлена, не містила вакуолей та просвітлених зон. У більшості тварин не проглядалися (або вони були суттєво зменшені)

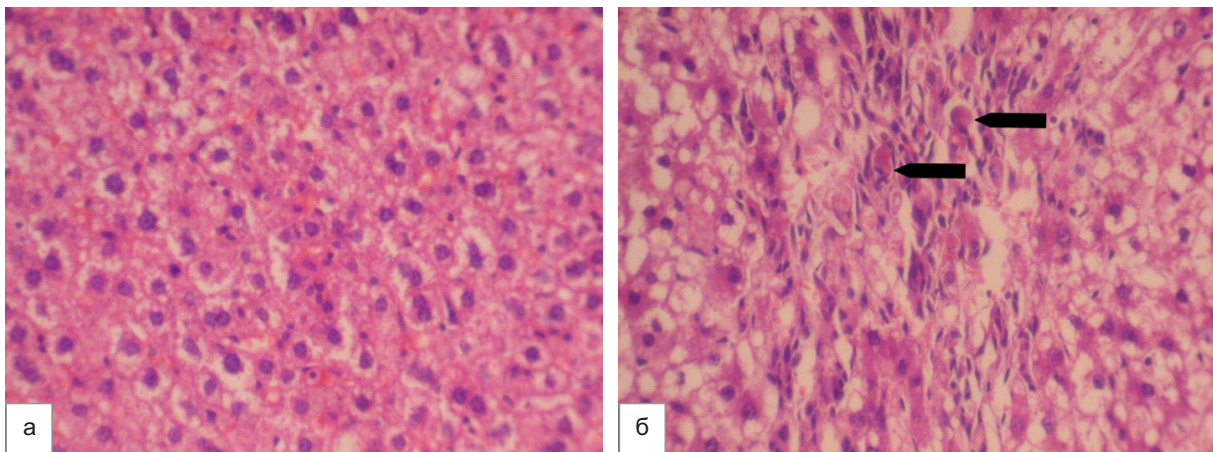


Рис. 4. Печінка щура після введення стрептозотоцину з нікотинамідом на тлі попередньої довготривалої ВКД: а) – дисконкомплексція печінкових балок, цитоплазма гепатоцитів містить вакуолі та світлі, з нечіткими абрисами зони; б) – тільця Каунсільмена серед дистрофічно змінених гепатоцитів; гематоксилін-еозин, $\times 250$

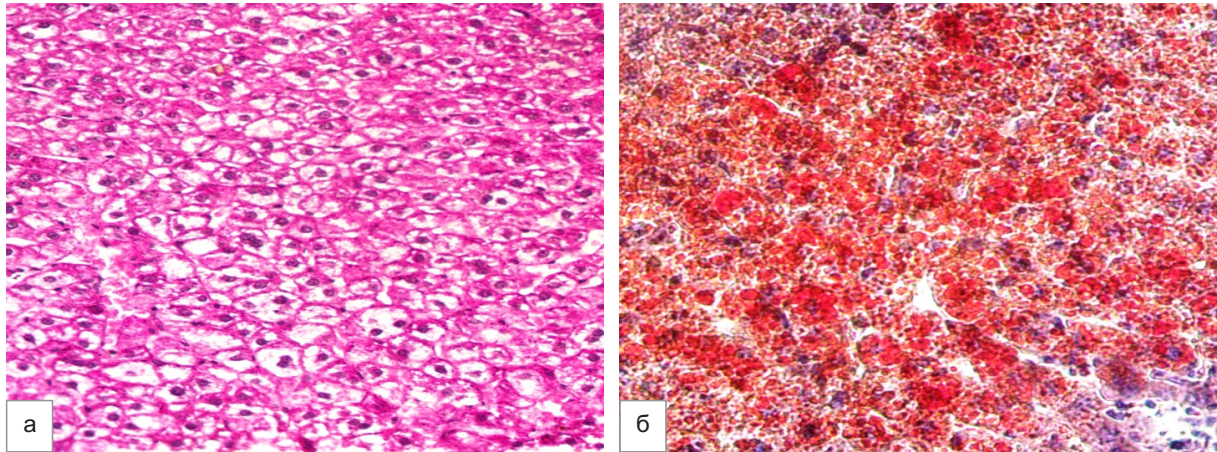


Рис. 5. Печінка щура після введення стрептозотозину з нікотинамідом на тлі попередньої довготривалої ВКД;
 а) – зменшення гранул глікогену в цитоплазмі клітин (ШИК-реакція за Мак-Манусом, x200);
 б) – накопичення жиру в гепатоцитах (судан IV, x250)

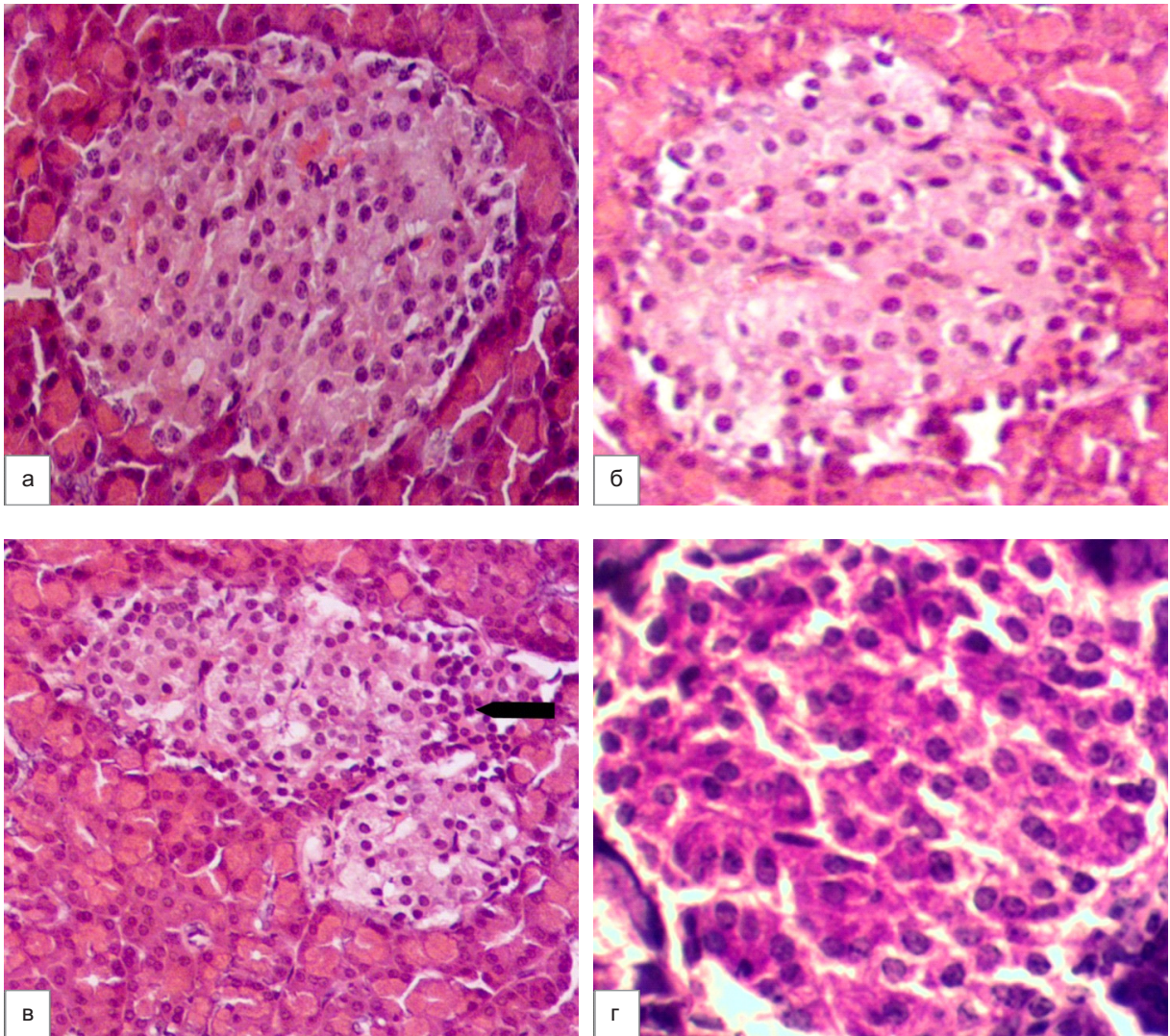


Рис. 6. Підшлункова залоза щура з ЦД2 після введення фітокомпозиції: а) – наблизений до норми панкреатичний острівцеві (x200);
 б) – помірне спустошення та вакуолізація β -клітин в острівці (x250); в) – проліферація клітин з дрібними темними ядрами та вузькою смужкою цитоплазми; г) – достатньо виразне відновлення фіолетового забарвлення цитоплазми багатьох β -клітин (x400);
 а-в) – гематоксилін-еозин, г) – альдегід-фуксин за Гоморі-гематоксилін

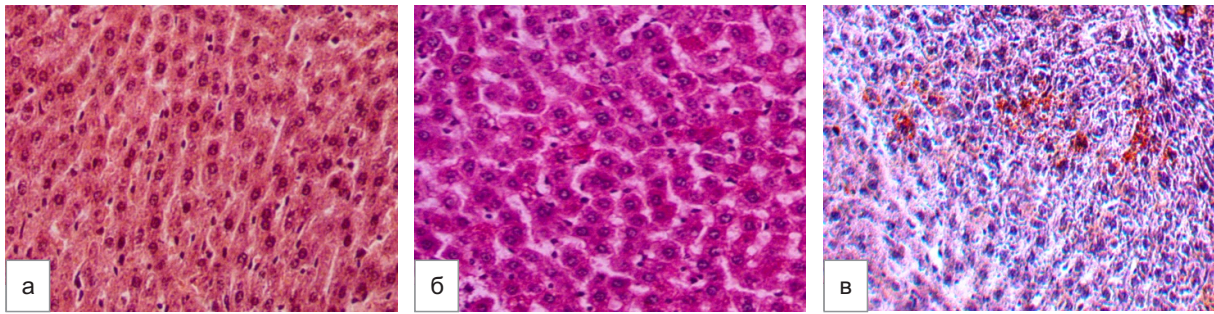


Рис. 7. Печінка щура з ЦД2 після введення фітокомпозиції: а) – нормальний стан гепатоцитів (гематоксилін-еозин, x250); б) – відновлена здатність клітин до накопичення глікогену (ШИК-реакція, x250); в) – накопичення дрібних крапель ліпідів у цитоплазмі окремих груп клітин (судан IV, x400)

мікроциркуляторні розлади. Пул двоядерних гепатоцитів зорозов збільшений, багато клітин з анізонуклеозом (коливання розміру ядер – збільшення розміру – посилення синтезу білка). Круглоклітинна інфільтрація портальних трактів відсутня. Майже відновлена здатність клітин до накопичення глікогену, практично відсутня жирова дистрофія гепатоцитів – накопичення дрібних крапель ліпідів виявили в цитоплазмі окремих груп клітин (рис. 7).

Після аналогічного за схемою введення збору «Арфазетин» частина ПО містила дегенеративно та дистрофічно змінені β -клітини, була спустошена, у них спостерігали помірну проліферацію клітин з дрібними компактними темними ядрами і невеликою смужкою цитоплазми. Виразність проліферації α -клітин у різних острівцях коливалась. Морфологічний стан значної кількості острівців візуально відповідав нормальному. У ПО загалом збільшена виразність альдегід-фуксифільного рівномірного фарбування β -клітин, хоча в частині ПО окремими дрібними зонами було доволі слабке забарвлення клітин або його відсутність (рис. 8). Помітних змін екзокринної паренхіми в більшості щурів не виявили, іноді спостерігали дуже помірну круглоклітинну вогнищеву інфільтрацію міжацинарної строми.

Морфометричний аналіз засвідчив підвищення на 63 % ($p < 0,001$) оптичної щільності ПО проти КП. Частка дрібних і середніх ПО змінювалась щодо патології: у 2,2 (менше) та у 2,6 рази (більше, $p < 0,001$) відповідно. Інтенсивність альдегід-фуксифільного забарвлення становила 2,3 бала ($p < 0,05$) (табл.).

Гістоструктура печінкової паренхіми майже в половини щурів після введення збору «Арфазетин» була наближеною до інтактного контролю. Гепатоцити морфологічно повноцінні, спостерігали виразний анізонуклеоз. Більше пул двоядерних клітин. У решти дистрофія була вогнищеву. У зонах з найбільш виразними ознаками дистрофії балковий малюнок іноді порушений. Інтенсивність ШИК-реакції в цитоплазмі гепатоцитів у різних щурів коливалась від нормальної до зниженої. Жирові вакуолі мали дрібнокрапельний характер, виявили мозаїчно у всіх щурів (рис. 9).

Мікроскопічна картина інкреторного апарату щурів з ЦД2 після введення таблеток «Метформін» була така: частина ПО була візуально не змінена, частина – з ознаками зональної спустошеності й дистрофії клітин; проліферації α -клітин не виявили. Проліферація клітин з темними невеликими ядрами та вузькою смужкою цитоплазми в деяких острівцях виражена. Фарбування альдегід-фуксином засвідчило достатню насиченість цитоплазми значної кількості β -клітин специфічними гранулами (рис. 10). Екзокринна паренхіма без помітних змін.

Проведена морфометрія засвідчила, що оптична щільність панкреатичних острівців збільшилась проти контрольної патології на 65 % ($p < 0,001$). Достатньо показово зменшилась частка дрібних ПО (у 2,3 рази, $p < 0,05$) та збільшилась частка середніх ПО (у 3,2 рази, $p < 0,001$) (табл.). Виразність альдегід-фуксифільного забарвлення становила 2,5 бала ($p < 0,01$) (табл.).

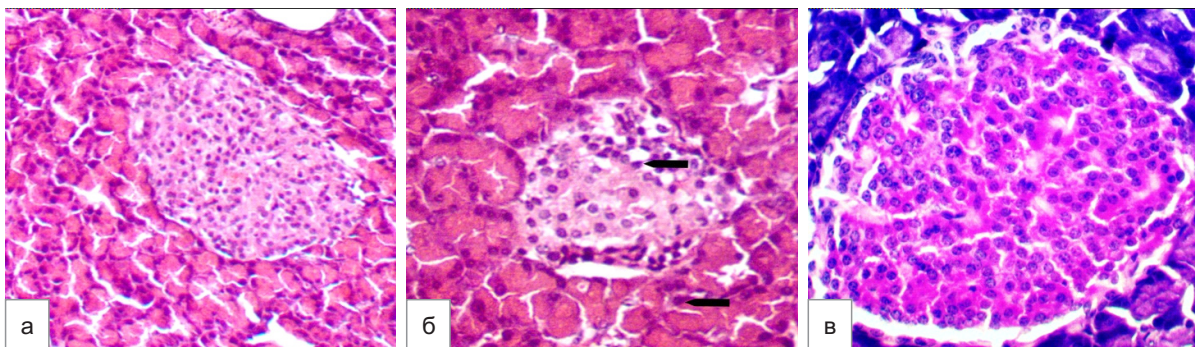


Рис. 8. Підшлункова залоза щура з ЦД2 після введення збору «Арфазетин»: а) – нормальний панкреатичний острівець (x200); б) – помірне спустошення та вакуолізація β -клітин в острівці, проліферація клітин з дрібними компактними темними ядрами і невеликою смужкою цитоплазми (x250); в) – доволі виразне фіолетове забарвлення цитоплазми більшості β -клітин (x250); а-б) – гематоксилін-еозин, в) – альдегід-фуксин за Гоморі-гематоксилін

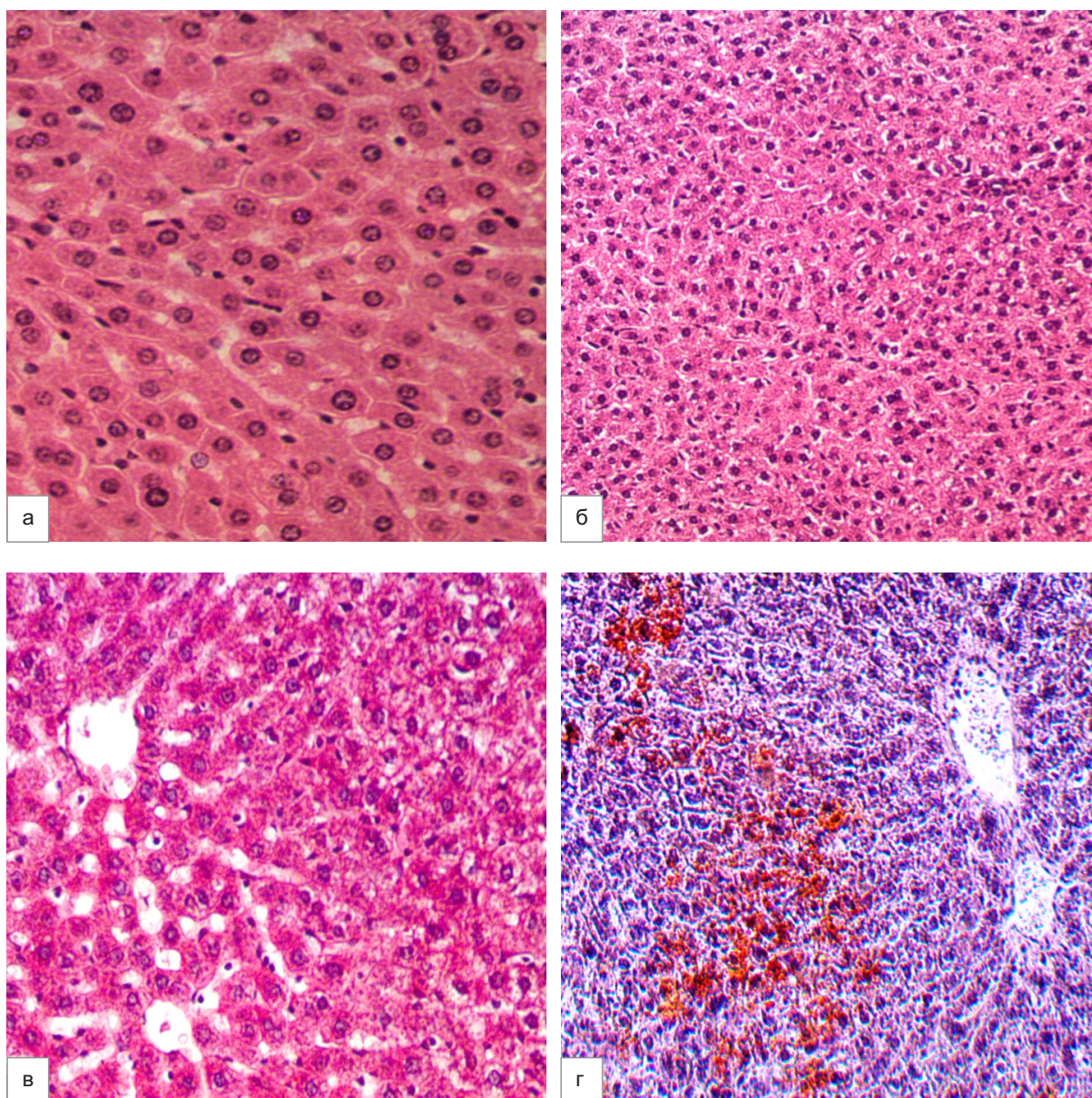


Рис. 9. Печінка щура з ЦД2 після введення збору «Арфазетин»: а) – стан печінкової паренхіми наближений до нормального (x250); б) – помірна дистрофія гепатоцитів (x200); в) – мозаїчне відкладення дрібних жирових крапель у гепатоцитах (x250); а-б) – гематоксилін-еозин, в) – ШИК-реакція, г) – судан IV

Помітне покращення спостерігали і в стані печінки цих щурів (рис. 11). Будова печінкових балок збережена, наближена до типової. Самі гепатоцити нормального розміру, ядра клітин нормохромні, з чіткими великими ядерцями, кількість яких іноді становила 2-3. Виявили чіткий анізонуклеоз. Ознаки гепатолізу дуже рідкі, пул двоядерних клітин збільшений. Мікроциркуляція тканини покращена. Фарбування на глікоген виявило виразне відновлення інтенсивності ШИК-реакції; фарбування суданом – дуже дрібні ліпідні краплі в окремих гепатоцитах, які не порушували цілісності клітин.

Отже, на основі отриманих даних можемо висувати про таке. Введення розчину стрептозоточину внутрішньочеревно, одноразово, з попереднім (за 15 хв) введенням нікотинаміду інтраперитоніально на тлі утримування щурів на високожировій дієті підтверджує важливість аліментарного фактора для розвитку

ЦД2 та призводить до пригнічення інсулінпродуктивного апарату підшлункової залози тварин, розвитку токсико-дистрофічних змін печінки з порушенням жирового та вуглеводного обміну. У підшлунковій залозі візуалізується зменшення оптичної щільності острівців, збільшення частки дрібних та зменшення частки середніх ПО; виникнення дистрофічних і деструктивних змін острівцевих клітин, спустошення деяких острівців. Із цим відбувається виразне зменшення інтенсивності фарбування цитоплазми β -клітин альдегід-фуксином (вмісту інсуліну).

З літературних джерел [17] відомо, що існує субпопуляція панкреатичних β -клітин невеликого розміру з високою мітотичною активністю і низькою чутливістю до стрептозоточину. Можливо, спостережані нечисленні клітини з дрібними компактними ядрами та вузькою смужкою цитоплазми в місцях спустошення в острівцях і є ці малі β -клітини, а поява

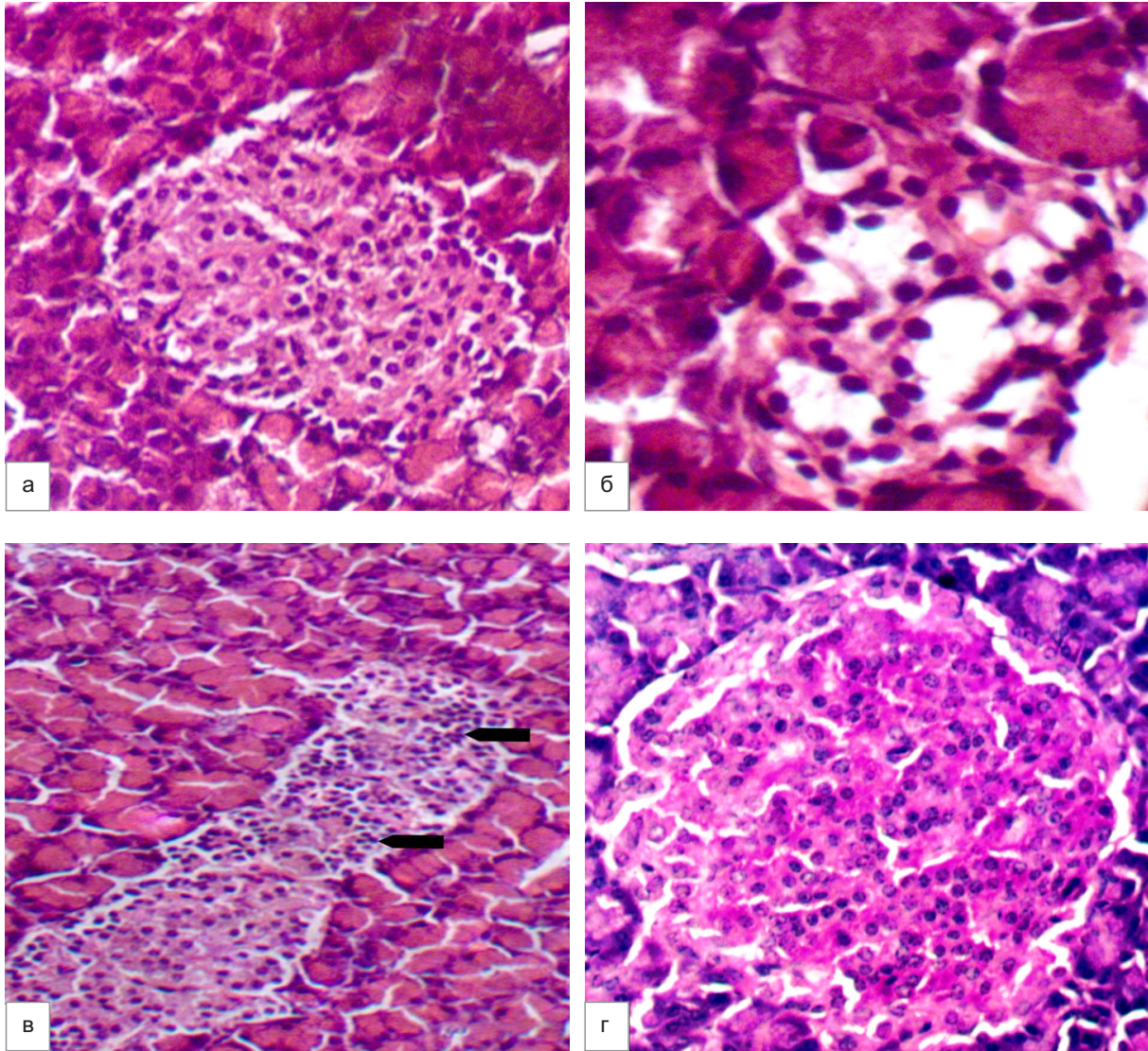


Рис. 10. Підшлункова залоза щура з ЦД2 після введення таблеток «Метформін»: а) – неушкоджений панкреатичний острівцев (x200); б, в) – виразна вакуолізація цитоплазми β -клітин, хаотичне розташування клітин (x400); г) – відновлення фіолетового забарвлення цитоплазми більшості β -клітин (x200); а-в) – гематоксилін-еозин, г) – альдегід-фуксин за Гоморі-гематоксилін

їх – прояв регенераційних процесів, намагання відновити пул β -клітин.

Лікувально-профілактичне введення досліджуваної фітокомпозиції позитивно вплинуло на прояви морфологічних ознак порушення структурно-функціонального стану ендокринної складової підшлункової залози щурів. Застосування фітозасобу призвело до збільшення оптичної щільності ПО (якщо порівнювати з КП), зменшення кількості дрібних

острівців і зростання середніх, покращення морфофункціонального стану β -клітин: зменшення ознак дистрофічних змін, відновлення альдегід-фуксифільного фарбування цитоплазми (вмісту гранул інсуліну в цитоплазмі). Фітокомпозиція мала стимулювальний вплив на регенераційні процеси в інсулінпродукувальному апараті підшлункової залози щурів – виразність проліферації малих β -клітин у ПО значно зростала проти КП.

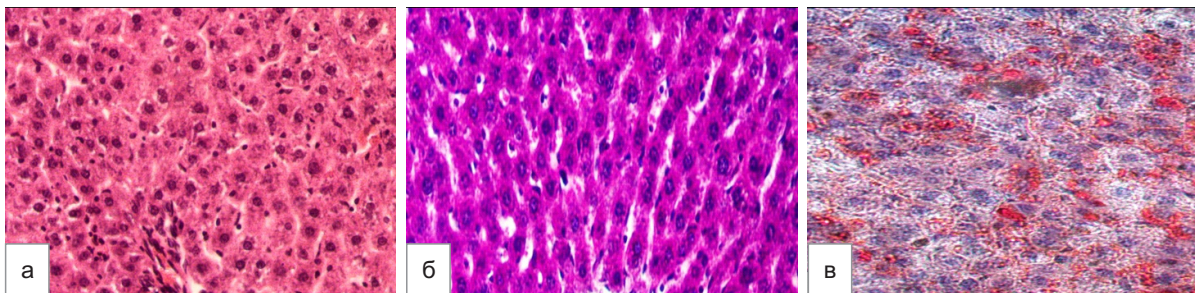


Рис. 11. Печінка щура з ЦД2 після лікувального введення таблеток «Метформін»: а) – відновлення нормальної структури паренхіми (гематоксилін-еозин); б) – рівномірне накопичення гранул глікогену в гепатоцитах (ШИК-реакція); в) – дуже дрібні жирові вкраплення в цитоплазмі частини клітин (судан IV); x250

Досліджуваний засіб на морфологічному рівні виявив гепатопротекторні властивості, значно зменшуючи прояви токсико-дистрофічної дії діабетогенів та відновлюючи жировий і вуглеводний обмін у гепатоцитах.

Висновки та перспективи подальших досліджень. За виразністю позитивного впливу на стан ендокринної складової підшлункової залози й печінки

щурів на зазначеній експериментальній моделі фітокомпозиція не поступається референс-препарату «Метформін» та перевищує референс-препарат «Арфазетин». Досліджувана фітокомпозиція є перспективним засобом для лікування цукрового діабету 2 типу і потребує подальшого вивчення.

Конфлікт інтересів: відсутній.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

- AlOtaibi A. A., Almesned M., Alahaideb T. M. Assessment of diabetes-related distress among type 2 diabetic patients. *J Family Med Prim Care*. 2021. Vol. 10, № 9. P. 3481-3489.
- Global Burden of Disease Study 2017 / Institute for health metrics and evaluation, Seattle. Washington, 2018. URL: https://www.healthdata.org/sites/default/files/files/policy_report/2019/GBD_2017_Booklet.pdf (Date of access: 20.11.2023).
- Nasheeta Peer, Yuseshta Balakrishna, Solange Durao. Screening for Type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020. Vol. 5, № 5. CD005266. DOI: 10.1002/14651858.CD005266.pub2/information.
- Атлас: Діабет в Україні / М. Д. Тронько [та ін.]. Київ : ІНДАР, 2021. Вип. 1. 136 с.
- McCreight L. J., Bailey C. J., Pearson E. R. Metformin and the gastrointestinal tract. *Diabetologia*. 2016. Vol. 59, № 3. P. 426-435.
- Kanat M., DeFronzo R. A., Abdul-Ghani M. A. Treatment of prediabetes. *Diabetes*. 2015. Vol. 6, № 12. P. 1207-1222.
- Blumberg J. B., Camesano T. A., Cassidy A. Cranberries and their bioactive constituents in human health. *Adv. Nutr.* 2013. Vol. 4. P. 618-632.
- Schaffer S., Won Kim H. Effects and Mechanisms of Taurine as a Therapeutic Agent. *Biomol Ther (Seoul)*. 2018. Vol. 26, № 3. P. 225-241.
- de l'Europe C. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. *European Treaty Series*. № 123. Strasbourg, 1986. 11 p. URL: <https://rm.coe.int/168007a67b> (Date of access: 20.11.2023).
- Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Union*. 2010. L276/33. P. 33-79. URL: <http://data.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj> (Date of access: 20.11.2023).
- Про внесення змін до деяких законів України щодо спрощення умов ведення бізнесу в Україні : Закон України № 1759-VI від 15.12.2009. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/1759-17#Text> (дата звернення: 20.11.2023).
- Islam S., Choi H. Nongenetic Model of Type 2 Diabetes: A Comparative Study. *Pharmacology*. 2007. Vol. 79. P. 243-249.
- Maynard R., Downes N., Finney B. *Histological techniques: an introduction for beginners in toxicology*. Cambridge : Royal Society of Chemistry, 2014. 334 p.
- Kiernan J. A. *Histological and histochemical methods: theory and practice*. 5th ed. Banbury : Scion Publishing, 2015. 571 p.
- Layton C., Bancroft J. D., Suvarna S. K. *Fixation of tissues. Bancroft's theory and practice of histological techniques*. 8 th ed. St. Louis : Elsevier, 2019. P. 40-63.
- Dilworth L., Facey A., Omoruyi F. Diabetes Mellitus and Its Metabolic Complications: The Role of Adipose Tissues. *Int J Mol Sci*. 2021. Vol. 22, № 14. P. 7644. DOI: 10.3390/ijms22147644.
- Li V. L., Kim J. T., Long J. Z. Adipose tissue lipokines: Recent progress and future directions. *Diabetes*. 2020. Vol. 69. P. 2541-2548. DOI: 10.2337/dbi20-0012.

REFERENCES

- AlOtaibi, A. A., Almesned, M., Alahaideb, T. M. (2021). Assessment of diabetes-related distress among type 2 diabetic patients. *J Family Med Prim Care*, 10(9), 3481-3489.
- Global Burden of Disease Study (2017). Washington, 2018. Available at: https://www.healthdata.org/sites/default/files/files/policy_report/2019/GBD_2017_Booklet.pdf.
- Nasheeta Peer, Yuseshta Balakrishna, Solange Durao. (2020). Screening for Type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst Rev*, 5(5), CD005266. doi: 10.1002/14651858.CD005266.pub2/information.
- Tronko, M. D., Kozhan, N. Ye., Pkhakadze, O. H., Zabolotko, V. M., Krushynska, Z. H. Ocheretko, V. H. ta in. (2021). Atlas: Diabet v Ukraini. Vyp. 1. Kyiv: INDAR.
- McCreight, L. J., Bailey, C. J., Pearson, E. R. (2016). Metformin and the gastrointestinal tract. *Diabetologia*, 59(3), 426-435.
- Kanat, M., DeFronzo, R. A., Abdul-Ghani, M. A. (2015). Treatment of prediabetes. *Diabetes*, 6(12), 1207-1222.
- Blumberg, J. B., Camesano, T. A., Cassidy, A. (2013). Cranberries and their bioactive constituents in human health. *Adv. Nutr.*, 4, 618-632.
- Schaffer, S., Won Kim, H. (2018). Effects and Mechanisms of Taurine as a Therapeutic Agent. *Biomol Ther (Seoul)*, 26 (3), 225-241.
- de l'Europe, C. (1986). European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. *European Treaty Series*, 123. Strasbourg, 1986. 11 p. Available at: <https://rm.coe.int/168007a67b>.
- Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Union*, L276/33, 33-79. Available at: <http://data.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj>.
- MOZ Ukrainy. (2009). Zakon Ukrainy № 1759-VI vid 15.12.2009. Pro vnesennia zmin do deiakykh zakoniv Ukrainy shchodo sproshchennia umov vedennia biznesu v Ukraini.
- Islam, S., Choi, H. (2007). Nongenetic Model of Type 2 Diabetes: A Comparative Study. *Pharmacology*, 79, 243-249.
- Maynard, R., Downes, N., Finney, B. (2014). *Histological techniques: an introduction for beginners in toxicology*. Cambridge: Royal Society of Chemistry.

14. Kiernan, J. A. (2015). *Histological and histochemical methods: theory and practice*. 5th ed. Banbury: Scion Publishing.
15. Layton, C., Bancroft, J. D., Suvarna, S. K. (2019). *Fixation of tissues. Bancroft's theory and practice of histological techniques*. 8 th ed. St. Louis: Elsevier.
16. Dilworth, L., Facey, A., Omoruyi, F. (2021). Diabetes Mellitus and Its Metabolic Complications: The Role of Adipose Tissues. *Int J Mol Sci.*, 22(14), 7644. doi: 10.3390/ijms22147644.
17. Li, V. L., Kim, J. T., Long, J. Z. (2020). Adipose tissue lipokines: Recent progress and future directions. *Diabetes*, 69, 2541-2548. doi: 10.2337/dbi20-0012.

Відомості про авторів:

Кононенко Н. М., доктор медичних наук, професор, завідувачка кафедри нормальної та патологічної фізіології, Національний фармацевтичний університет Міністерства охорони здоров'я України. E-mail: kononenkonn76@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3850-6942>

Анісімова М. С., аспірантка кафедри нормальної та патологічної фізіології, Національний фармацевтичний університет Міністерства охорони здоров'я України. E-mail: pathology@nuph.edu.ua. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9574-9713>

Information about authors:

Kononenko N. M., Doctor of Medicine (Dr. habil.), professor, head of the Department of Normal and Pathological Physiology, National University of Pharmacy of the Ministry of Health of Ukraine E-mail: kononenkonn76@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3850-6942>

Anisimova M. S., postgraduate student of the Department of Normal and Pathological Physiology, National University of Pharmacy of the Ministry of Health of Ukraine. E-mail: pathology@nuph.edu.ua. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9574-9713>

Надійшла до редакції 27.08.2024 р.