

ВПЛИВ ІНТЕРВАЛЬНОГО ГОЛОДУВАННЯ НА МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ ДОРΟΣЛИХ ЩУРІВ

Р. Янко

*Інститут фізіології імені О. О. Богомольця НАН України
вул. Богомольця, 4, Київ 01024, Україна
e-mail: biolag@ukr.net*

Літературні дані щодо впливу інтервального голодування (ІГ) на морфофункціональні зміни підшлункової залози (ПЗ), особливо її екзокринної частини, поодинокі. Мета нашої роботи полягала у дослідженні морфологічних змін екзо- й ендокринної частини ПЗ дорослих щурів після впливу ІГ. Дослідження проведено на 24 щурах-самцях лінії Wistar віком 15 місяців. Дослідні щури перебували на ІГ: 1 день повне голодування / 2 дні стандартний раціон. Доступ до води був вільним. Тривалість експерименту становила 28 діб. Щурів декапітували під легким ефірним наркозом. Роботу зі щурами проводили відповідно до принципів Гельсінської декларації. Із центральної частини (тіла залози) ПЗ виготовляли гістологічні препарати за стандартною методикою. З мікропрепаратів залози робили фотознімки за допомогою цифрової камери. Морфометрію залози здійснювали на цифрових зображеннях за допомогою комп'ютерної програми «Image J». Виявлено, що в екзокринній частині ПЗ дорослих щурів, які перебували на ІГ, збільшується площа ацинусів, ядер екзокриноцитів і зростає кількість у них ядерець, підвищується ядерно-цитоплазматичне співвідношення. В ендокринній частині залози дослідних щурів відбуваються більш інтенсивні морфологічні зміни, а саме: вірогідно збільшується її відносна площа (на 108 %), зростає середня кількість острівців Лангерганса на одиницю площі (на 44 %) і їхні лінійні розміри, підвищується кількість ендокриноцитів у острівцях (на 20 %). Також у залозі цих тварин виявлено зменшення відносної площі строми (на 21 %) і стромально-паренхіматозного індексу (на 28 %), а також зменшення ширини прошарків міжчасточкової (на 28 %) і міжацинусної (на 34 %) сполучної тканини, що поліпшує умови для перебігу процесів метаболізму. Таким чином, вплив ІГ супроводжується появою морфологічних ознак зростання активності як екзокринної, так і ендокринної (більшою мірою) частини ПЗ у дорослих щурів. Отримані дані можуть становити інтерес для практичної медицини у вирішенні питання про призначення даного типу голодування людям зі зниженою функцією ПЗ.

Ключові слова: інтервальне голодування, підшлункова залоза, морфометрія

Періоди добровільної відмови від їжі (тобто інтервальне голодування) практикували з найдавніших часів народи всього світу. Книги з етнології та релігії описують дивовижне різноманіття форм і практик голодування. Про поновлення інтересу до режимів голодування свідчить велика кількість наукових публікацій і рекомендацій щодо дієти [15].

Інтервальне голодування (ІГ) викликає еволюційно збережені адаптивні клітинні реакції, які інтегруються між органами. ІГ покращує регуляцію глікози, підвищує стійкість до стресу та пригнічує запалення. Під час голодування клітини активують шляхи, які посилюють внутрішній захист проти окисного та метаболічного стресу, а також ті, які видаляють або відновлюють пошкоджені молекули [6, 13]. Під час періоду голодування клітини беруть участь у специфічних для тканин процесах росту і пластичності. Дослідження на тваринах постійно показують надійну ефективність дії ІГ на широкий спектр хронічних

захворювань, включаючи ожиріння, цукровий діабет, серцево-судинні й ендокринні патології, новоутворення та нейродегенеративні захворювання мозку [17–19].

Але, незважаючи на добре вивчений ефект від голодування на організм, літературних даних щодо його впливу на морфофункціональну активність підшлункової залози (ПЗ) недостатньо, а отримані результати нерідко мають суперечливий характер. Більшість досліджень присвячено вивченню ефектів від голодування на ендокринну частину залози [8, 14]. Відомо, що голодування викликає фізіологічні зміни ендокринної частини ПЗ, а саме – зміни в секретії інсуліну, метаболізмі острівців Лангерганса та редокс-стані β -клітин [5]. Літературних даних щодо того, як змінюється гістоморфологічна структура екзокринної частини ПЗ при ІГ, нами не знайдено.

Метою нашої роботи було дослідити морфологічні зміни екзо- й ендокринної частини підшлункової залози дорослих щурів після впливу інтервального голодування.

Матеріали та методи

Дослідження проведено на 24 щурах-самцях лінії Wistar у віці 15 місяців (вагою 420 ± 10 г) в уніфікованих умовах, на стандартному раціоні харчування. Щури були поділені на 2 групи (по 12 тварин у кожній): I – контрольні тварини, II – дослідні щури, які перебували на ІГ, а саме: 1 день – повне голодування / 2 дні – стандартний раціон віварію. Доступ до води був вільний. Тривалість експерименту становила 28 діб. Щурів декапітували під легким ефірним наркозом. Роботу зі щурами проводили відповідно до принципів Гельсінської декларації 1975 р. та її перегляду 1983 р., а також згідно з «Правилами виконання робіт з використанням експериментальних тварин», затвердженими МОЗ України.

Для морфологічних і морфометричних досліджень із центральних ділянок тканини ПЗ виготовляли гістологічні препарати за стандартною методикою: фіксували у рідині Бюена, зневоднювали у спиртах зростаючої концентрації та діоксані, заливали у парафін. Зрізи фарбували гематоксиліном Бемера й еозинном, а для виявлення елементів сполучної тканини – методом Ван-Гізона [1]. Використовуючи цифрову камеру, мікропрепарати фотографували на мікроскопі «Nikon Eclipse E100» (Японія). На цифрових зображеннях препаратів здійснювали морфометричні виміри за допомогою комп'ютерної програми «Image J».

На гістологічних зрізах тканини ПЗ проводили гістоморфометричний аналіз її екзо- й ендокринної частин. В екзокринній частині залози вимірювали діаметр і площу поперечного перерізу ацинусів, висоту й площу екзокриноцитів, їхніх ядер і цитоплазми, підраховували кількість ядерців у ядрах екзокриноцитів і середню кількість клітин в ацинусі. В ендокринній частині залози підраховували середню кількість панкреатичних острівців на одиницю площі ($0,25 \text{ мм}^2$) та кількість у них ендокриноцитів, вимірювали площу й діаметр поперечного перерізу острівців, а також визначали щільність розташування клітин. Для визначення стану сполучнотканинних елементів у залозі вимірювали ширину прошарків міжчасточкової та міжацинусної сполучної тканини. Методом накладання точкових морфометричних сіток визначали відносну площу екзо- й ендокринної частини, а також строми в залозі [2, 3].

Отримані дані опрацьовували методами варіаційної статистики за допомогою програмного забезпечення «Statistica 6.0». Нормальність розподілу цифрових масивів перевіряли, використовуючи критерій Пірсона. Усі результати досліджень підпорядковувалися законові нормального розподілу. Достовірність відмінностей між контрольною та дослідною групами оцінювали за t-критерієм Стьюдента. Відмінності вважали достовірними за значенням $P < 0,05$.

Результати і їхнє обговорення

Маса тіла контрольних щурів за час експерименту мала незначну тенденцію до зростання, а у тварин, які перебували на ІГ, навпаки, зменшилася на 11 %. У дослідних щурів абсолютна маса ПЗ залишалася на рівні контролю, тоді як її відносна маса була вірогідно більшою на 16 % ($P < 0,05$) (табл. 1).

Таблиця 1

Маса тіла та підшлункової залози ($M \pm m$; $n=12$)

Показники	Маса тіла, г		Маса підшлункової залози	
	На початку досліду	Наприкінці досліду	Абсолютна, мг	Відносна (мг/г маси тіла)
Контроль	430 \pm 7	440 \pm 8	795 \pm 7	1,81 \pm 0,08
Дослід	435 \pm 13	385 \pm 13*	810 \pm 3	2,1 \pm 0,1*

Примітка: тут і в табл. 2 * $P < 0,05$ – вірогідність порівняно з контролем

Паренхіма ПЗ у щурів, які зазнавали впливу ІГ, зберігала фізіологічну структуру, що візуально поділялася на екзо- й ендокринну частини. Ацинуси мали округлу, овальну та видовжену форму. Зісередини ацинуси вистелені екзокриноцитами, які звуженою частиною (верхівкою) спрямовані до центру ацинуса, а протилежною, розширеною частиною (основа) – назовні. Цитоплазма клітин мала добре виражену зернистість, особливо у напрямку апікального полюсу. Ядро перебувало біля основи, де зернистість була виражена меншою мірою, і містило ядерця. Ацинуси об'єднувалися в часточки, покриті зовні сполучнотканинною оболонкою (рис. 1).

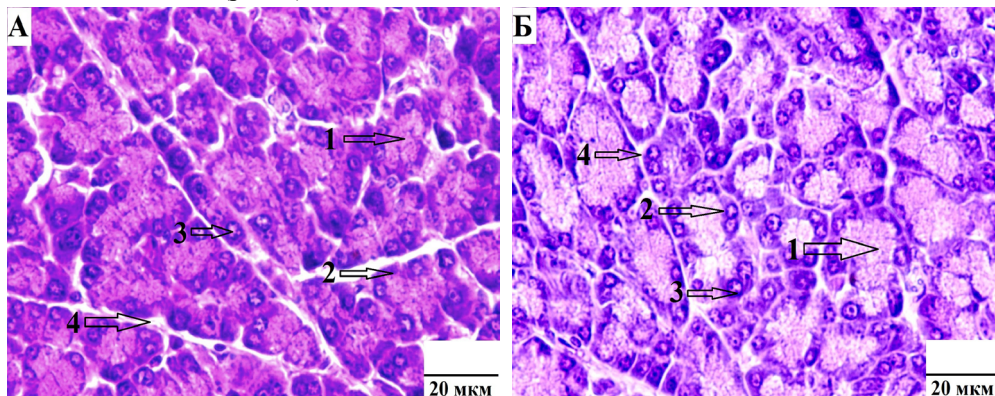


Рис. 1. Мікрофотографія екзокринної частини підшлункової залози щура контрольної групи (А) та після впливу інтервального голодування (Б): 1 – ацинус; 2 – екзокриноцит; 3 – ядро екзокриноцита; 4 – міжчасточкова сполучна тканина. Забарвлення гематоксиліном і еозином. $\times 800$

У дослідних щурів після впливу ІГ виявили вірогідне збільшення площі ацинусів на 13 % порівняно з контролем. Площа екзокриноцитів і їхньої цитоплазми у цих щурів не змінювалася. Тоді ж площа ядра вірогідно збільшилася на 13 %, що призвело до зростання ядерно-цитоплазматичного співвідношення на 18 %. Кількість ядерць у ядрах екзокриноцитів дослідних щурів була на 29 % ($P < 0,05$) більшою, ніж у контролі. Гіперплазія ядерць може бути однією з ознак активації білоксинтезувальної функції клітин або ознакою посилення фізіологічної регенерації на внутрішньоклітинному рівні [4]. У ПЗ тварин, які зазнавали впливу ІГ, виявили тенденцію до зростання висоти епітелію ацинусів на 6 % (табл. 2). Зміна цих показників свідчить про активацію функціонального стану екзокринної частини залози після впливу ІГ.

Таблиця 2

Морфометричні показники підшлункової залози (M±m; n=12)

Показники	Контроль	Дослід
<u>Екзокринна частина</u>		
Відносна площа екзокрин. частини, %	73,2±1,7	75,6±1,9
Середній діаметр ацинуса, мкм	27,7±0,71	28,9±0,5
Площа поперечного перерізу ацинуса, мкм ²	692±16	784±19*
Площа, мкм ²		
екзокриноцита	120,6±2,5	121,3±4,9
ядра	17,6±0,4	19,8±0,4*
цитоплазми	103±2,6	101,5±4,3
Ядерно-цитоплазматичне співвідношення	0,170±0,006	0,20±0,006*
Кількість ядерць в екзокриноциті, шт	1,48±0,05	1,91±0,07*
Висота епітелію ацинуса, мкм	11,2±0,2	11,9±0,4
Кількість екзокриноцитів в ацинусі, шт	7,8±0,2	7,5±0,2
<u>Ендокринна частина</u>		
Відносна площа ендокр. частини, %	2,6±0,5	5,4±0,7*
Середня кількість острівців (на 0,25 мм ²), шт	0,9±0,1	1,3±0,1*
Площа поперечного перерізу острівка, мкм ²	9538±92	12543±153*
Середній діаметр острівка, мкм	93,8±3,9	111,0±5,0*
Кількість ендокриноцитів в острівці, шт	119,8±16,8	144,2±17,6*
Щільність розміщення ендокриноцитів в острівці, шт/ мкм ²	0,013±0,001	0,011±0,001*
<u>Сполучна тканина</u>		
Відносна площа строми, %	24,2±1,0	19,0±1,1*
Стромально-паренхіматозний індекс	0,32±0,02	0,23±0,03*
Ширина прошарків спол. тканини, мкм		
міжчасточкова	3,81±0,32	2,76±0,15*
міжацинусна	0,96±0,02	0,63±0,02*

Ендокринна частина займає значно меншу частину тканини ПЗ. Вона утворена острівцями Лангерганса (ОЛ), які дисперсно розміщені в залозі. ОЛ відмежовані від ацинусів тонким сполучнотканинним прошарком і являють собою пронизані густою сіткою капілярів скупчення ендокриноцитів [12]. Форма ОЛ дослідних тварин переважно округла й овальна, рідше візуалізуються острівці видовженої форми (рис. 2).

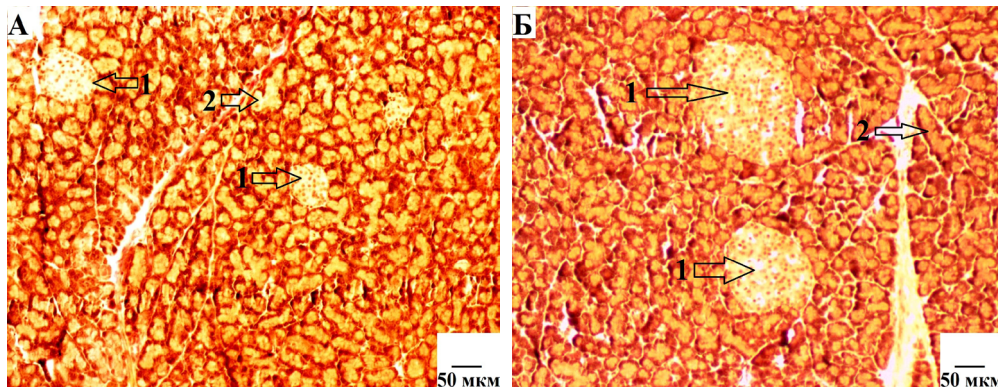


Рис. 2. Мікрофотографія підшлункової залози щура контрольної групи (А) та після впливу інтервального голодування (Б): 1 – острівець Лангерганса; 2 – ацинус. Забарвлення за методом Ван-Гізона. x200

В ендокринній частині ПЗ дослідних тварин після впливу ІГ виявили значні структурні зміни. Так, у них спостерігали вірогідне збільшення відносної площі ендокринної частини на 108 %. Середня кількість ОЛ (на 0,25 мм²) становила 1,3, що є на 44 % більшим, ніж у контролі. Також виявили достовірне зростання розмірів ОЛ, а саме: площі – на 32 % і

діаметра – на 18 %. Кількість ендокриноцитів у ОЛ дослідних щурів була більшою на 20 % ($P < 0,05$) порівняно з контрольними показниками (табл. 2; рис. 2). Зміна цих показників свідчить про суттєву активацію ендокринної частини ПЗ дорослих тварин після впливу ІГ.

До складу сполучнотканинних утворень ПЗ входить капсула та строма органа. В останній розділяють ацинозну, острівцеву та міжацинозну сполучну тканину (СТ); сполучнотканинні оболонки часток і часточок; міжчасткову і міжчасточкову СТ, а також СТ, яка оточує кровоносні судини й вивідні протоки. Усі перелічені утворення мають схожу структуру та переходять один в одного без різких меж. Але кожний із елементів сполучнотканинного остову має особливості архітекtonіки, якісного і кількісного складу волокнистих структур, кількості основної речовини, кількості й форми фібробластів [12, 16].

Нами виявлено, що у ПЗ щурів після впливу ІГ кількість стромы знижувалась. Про це свідчить вірогідно менша її відносна площа на 21 % і стромально-паренхіматозний індекс (відношення відносної площі стромы до площі паренхіми) – на 28 % порівняно з контролем. Ширина прошарків міжчасточкової та міжацинозної СТ була вірогідно меншою на 28 і 34 % відповідно (табл. 2). Строма є найважливішим складовим компонентом гістогематичного бар'єру, і зменшення її кількості й товщини прошарків полегшує транспорт кисню до паренхіматозних елементів залози, поліпшує умови перебігу процесів метаболізму, сприяє кращому проникненню гормонів через гістогематичний бар'єр у кров.

Позитивну роль голодування на ПЗ виявили й інші дослідники. В експериментах на мишах з індукованим цукровим діабетом, які перебували на ІГ, виявлено зниження симптомів даної патології. Так, у цих тварин ІГ збільшувало проліферацію β -клітин, нівелювало симптоми діабету, відновлювало секрецію інсуліну і гомеостаз глюкози [8]. Однак механізм, за допомогою якого обмежене харчування впливає на функцію β -клітин, залишається нез'ясованим. В іншому дослідженні показано, що 8-тижневі щури лінії Sprague-Dawley, які отримували раціон зі зниженою на 30 % калорійністю, мали більшу активність β -клітин. Про це свідчить рання секреція інсуліну під час внутрішньочеревного тесту толерантності до глюкози, ніж у контрольних тварин. Крім того, тварини після впливу обмеженого харчування мали більшу масу β -клітин і проліферацію їх у ПЗ [10]. Також виявлено, що обмеження калорій здатне перешкоджати розвитку та викликає затримку в прогресуванні панкреатичних інтраепітеліальних новоутворень [11]. Інші автори дослідили, що ІГ має значно більший протираковий ефект у ПЗ генетично модифікованих моделей мишей, ніж постійна дія обмеженого харчування [7]. Показано, що вплив 40 % обмеженого харчування змінює β -клітинну дисфункцію і резистентність до інсуліну, відновлює гомеостаз глюкози, активує аутофагію β -клітин у мишей [9]. У іншому дослідженні, проведеному на місячних самках щурів, показано, що ІГ (1 день повне голодування / 1 день звичайний раціон) протягом 12 тижнів призводить до зменшення маси ПЗ, збільшує продукцію активних форм кисню й активує апоптоз в ОЛ, сприяє дисфункції β -клітин [14].

Таким чином, аналіз літератури ще раз підтверджує неоднозначність даних стосовно морфофункціонального стану ендокринної частини ПЗ тварин, які отримували обмежене харчування. Це може бути пов'язано з різними типами голодування, різною тривалістю проведення експериментів, віком і статтю тварин тощо. Усе це обумовлює продовження досліджень у даному напрямі для розкриття механізмів впливу голодування на активність ПЗ.

Отже, 28-добовий вплив ІГ (1 день повне голодування / 2 дні стандартний раціон) має морфологічні ознаки підвищення функціональної активності як екзокринної, так і ендокринної (більшою мірою) частини ПЗ у дорослих щурів. В екзокринній частині про це свідчить зростання площі ациносів, ядер ендокриноцитів і збільшення кількості в них яде-

рець, підвищення ядерно-цитоплазматичного співвідношення. На підвищення активності ендокринної частини ПЗ після впливу ІГ вказують суттєве збільшення її відносної площі, зростання середньої кількості острівців Лангерганса та їхніх розмірів, а також кількості ендокриноцитів в острівцях. Зменшення кількості строми в залозі полегшує транспорт кисню до її паренхіматозних елементів і поліпшує умови перебігу процесів метаболізму. Ці дані можуть мати теоретичне значення і водночас становлять певний практичний інтерес щодо використання ІГ для підвищення функції ПЗ.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Журавлева С. А. Гистология. Практикум. Минск: Вышэйшая школа, 2013. 320 с.
2. Янко Р. В., Левашов М. И. Морфологические отличия поджелудочной железы нормо- и гипертензивных крыс после сочетанного воздействия прерывистой гипоксии и мелатонина // Журнал Белорус. гос. ун-та. Биология. 2021. № 1. С. 3–11. DOI: 10.33581/2521-1722-2021-1-3-11.
3. Adeyemi D., Komolafe O. O., Obuotor E. et al. Histomorphological and morphometric studies of the pancreatic islet cells of diabetic rats treated with extracts of *Annona muricata* // Folia Morphol. 2010. Vol. 69. N 2. P. 92–100.
4. Boisvert F., Konningsbruggen S., Navascues J., Lamond A. The multifunctional nucleolus // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2007. Vol. 8. N 7. P. 574–585.
5. Bonassa A. M., Carpinelli A. R. Intermittent fasting for three months decreases pancreatic islet mass and increases insulin resistance in Wistar rats // Endocrine Abstracts. 2018. Vol. 56. P. 519. DOI: 10.1530/endoabs.56.P519.
6. Cabo R., Mattson M. P. Effects of intermittent fasting on health, aging, and disease // N Engl. J. Med. 2019. Vol. 381. P. 2541–2551. DOI: 10.1056/NEJMra1905136.
7. Chen Y., Ling L., Su G. et al. Effect of intermittent versus chronic calorie restriction on tumor incidence: A systematic review and meta-analysis of animal studies // Scientific Reports. 2016. N 6. P. 33739. DOI: 10.1038/srep33739.
8. Cheng C. W., Villani V., Buono R. et al. Fasting-Mimicking diet promotes Ngn3-Driven b-cell regeneration to reverse diabetes // Cell. 2017. Vol. 168. N 5. P. 775–788. DOI: 10.1016/j.cell.2017.01.040.
9. Gao X., Yan D., Zhao Y. et al. Moderate calorie restriction to achieve normal weight reverses β -cell dysfunction in diet-induced obese mice: involvement of autophagy // Nutrition & Metabolism. 2015. N 12. P. 34. DOI: 10.1186/s12986-015-0028-z.
10. He X. Y., Zhao X. L., Gu Q. et al. Calorie restriction from a young age preserves the functions of pancreatic β cells in aging rats // Tohoku J. Exp. Med. 2012. Vol. 227. N 4. P. 245–252.
11. Lanza-Jacoby S., Yan G., Radice G. et al. Calorie restriction delays the progression of lesions to pancreatic cancer in the LSL-KrasG12D; Pdx-1/Cre mouse model of pancreatic cancer // Exp Biol Med (Maywood). 2013. Vol. 238. N 7. P. 787–797. DOI: 10.1177/1535370213493727.
12. Longnecker D. S. Anatomy and histology of the pancreas. Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base. 2021. DOI: 10.3998/panc.2021.01.
13. Longo V. D., Mattson M. P. Fasting: molecular mechanisms and clinical applications // Cell Metab. 2014. Vol. 19. N 2. P. 181–192. DOI: 10.1016/j.cmet.2013.12.008.
14. Munhoz A. C., Vilas-Boas E. A., Panveloski-Costa A. C. et al. Intermittent fasting for twelve weeks leads to increases in fat mass and hyperinsulinemia in young female Wistar rats // Nutrients. 2020. Vol. 12. N 4. P. 1029. DOI:10.3390/nu12041029.
15. Patterson R. E., Laughlin G. A., LaCroix A. Z. et al. Intermittent Fasting and Human Metabolic Health // J. Acad. Nutr. Diet. 2015. Vol. 115. N 8. P. 1203–1212. DOI:10.1016/j.jand.2015.02.018.

16. Purice G. I., Onose G. Microanatomical study of the human pancreatic made on necroptic pieces // *J. Med. Life*. 2012. № 5 (Spec Issue). P. 102–109.
17. Speakman J. R., Mitchell S. E. Caloric restriction // *Mol. Aspects. Med.* 2011. Vol. 32. P. 159–221.
18. Weiss E. P., Fontana L. Caloric restriction: powerful protection for the aging heart and vasculature // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2011. Vol. 301. N 4. P. H1205–H1219. DOI: 10.1152/ajpheart.00685.2011.
19. Yanko R. V., Levashov M. I. Effect of interval fasting on morphological changes in the rat thyroid gland of different age // *Biological Sciences of Kazakhstan*. 2021. N 1. P. 8–18. DOI: 10.52301/1684-940X-2021-1-8-18.

Стаття надійшла до редакції 17.06.22

доопрацьована 05.07.22

прийнята до друку 06.07.22

EFFECT OF INTERVAL FASTING ON THE MORPHO-FUNCTIONAL STATE OF THE PANCREAS IN ADULT RATS

R. Yanko

*Bogomoletz Institute of Physiology, NAS of Ukraine
4, Bogomoletz St., Kyiv 01024, Ukraine
e-mail: biolag@ukr.net*

Literature data on the effect of interval fasting (IF) on the morphological and functional changes in the pancreas, especially its exocrine part, are rare. The aim of our work was to study the morphological changes in the exo- and endocrine pancreas of adult rats after the influence of IF. The study was carried out on 24 male Wistar rats at the age of 15 months. Experimental rats were on IF: 1 day – complete fasting / 2 days – standard diet. Access to water was free. The duration of the experiment was 28 days. Rats were decapitated under light ether anesthesia. Work with rats was carried out in accordance with the principles of the Helsinki Declaration. Histological preparations were made from the central part (the body of the gland) according to the standard method. From micropreparations of the gland, photographs were taken using a digital camera. Gland morphometry was performed on digital images using the «Image J» computer program. It was revealed that in the exocrine pancreas of adult rats that were on IF, the area of acinus, nucleus of exocrinocytes increases and the number of nucleolus increases, the nuclear-cytoplasmic ratio increases. In the endocrine pancreas of experimental rats, more intense morphological changes occur, namely: its relative area probably increases (by 108 %), the average number of Langerhans islets increases (by 44 %) and their linear dimensions increase, the number of endocrine cells increases (by 20 %). Also in the gland of these animals, a decrease in the relative area of the stroma (by 21 %) and the stromal-parenchymal index (by 28 %), as well as a decrease in the width of the layers of the interlobular (by 28 %) and interacinus (by 34 %) connective tissue, which improves conditions for the course of metabolic processes. Thus, the effect of IF is accompanied by the appearance of morphological signs of an increase in the activity of both the exocrine and endocrine (to a greater extent) pancreas in adult rats. The data obtained may be of interest for practical medicine when deciding whether to prescribe this type of hunger strike to people with reduced pancreas function.

Keywords: interval fasting, pancreas, morphometry