

Т.В. Иваненко, А.В. Абрамов, Ю.М. Колесник, Г.В. Василенко

Эндокринный статус и уровень экспрессии белков Bcl-2 и p53 в панкреатических островках у крыс с экспериментальным сахарным диабетом

Запорожский государственный медицинский университет

Ключевые слова: поджелудочная железа, сахарный диабет, инсулин, апоптоз, пролиферация.

У лабораторных крыс с экспериментальным сахарным диабетом изучены особенности синтеза инсулина, экспрессии маркеров апоптоза и пролиферации бета-клеток. При сахарном диабете оставшиеся бета-клетки компенсаторно гипертрофируются, и в них увеличивается концентрация инсулина. В значительной мере снижается выработка антиапоптотического белка Bcl-2. Развитие диабета приводит к существенному снижению пролиферативной активности эндокриноцитов панкреатических островков.

Ендокринний статус та рівень експресії білків Bcl-2 та p53 в панкреатичних острівцях у щурів з експериментальним цукровим діабетом

Т.В. Иваненко, А.В. Абрамов, Ю.М. Колесник, Г.В. Василенко

У лабораторних щурів з експериментальним цукровим діабетом вивчено особливості синтезу інсуліну, експресії маркерів апоптозу та проліферації бета-клітин. При розвитку цукрового діабету бета-клітини, що залишилися, компенсаторно гіпертрофуються, і в них підвищується концентрація інсуліну. Значною мірою знижується вироблення антиапоптотичного білка Bcl-2. Розвиток діабету призводить до суттєвого зниження проліферативної активності ендокриноцитів панкреатичних острівців.

Ключові слова: підшлункова залоза, цукровий діабет, інсулін, апоптоз, проліферація.

Патологія. – 2011. – Т.8., №2. – С. 18–20

Endocrine status and the level of Bcl2 and p53 protein expression in pancreatic islets of rats with experimental diabetes mellitus

T.V. Ivanenko, A.V. Abramov, Yu.M. Kolesnik, G.V. Vasilenko

Peculiarities of insulin synthesis, the expression of apoptosis markers and proliferation of beta cells in laboratory rats with experimental diabetes mellitus were studied. With the development of diabetes mellitus remained beta cells compensatory hypertrophy and insulin concentrations are increased. The production of anti-apoptotic protein Bcl2 reduced to a considerable extent. Development of diabetes significantly reduces the proliferative activity of pancreatic islets endocrinocytes.

Key words: pancreas; diabetes mellitus, insulin, apoptosis, cell proliferation.

Pathologia. 2011; 8(2): 18–20

Известно, что ключевым звеном патогенеза сахарного диабета 1 типа (СД) является аутоиммунная деструкция бета-клеток панкреатических островков, гибель которых происходит путем некробиоза и апоптоза [1]. При этом, характер течения СД зависит не только от интенсивности процессов гибели бета-клеток, но и от скорости их пролиферации и дифференцировки из клеток протокового эпителия [2]. Одними из хорошо изученных молекулярных маркеров клеточного апоптоза являются белки Bcl-2 и p53.

Внутриклеточный белок Bcl-2, выступая в роли регулятора апоптоза, ингибирует каспазы за счет предотвращения выхода цитохрома С из митохондрий и/или за счет связывания фактора, активирующего апоптоз — АРАF1 [3]. В связи с этим белок Bcl-2 проявляет антиапоптотическую функцию, подавляя апоптоз во многих клеточных системах, включая и эндокриноциты поджелудочной железы.

Продукция другого клеточного белка – p53, стимулируется при повреждениях генетического аппарата клетки, а также при любых стимулах, которые могут привести к подобным повреждениям или являются сигналом о неблагоприятном состоянии клеток [4]. Функция белка p53 состоит в удалении из пула реплицирующихся клеток,

тех, которые повреждены или являются потенциально опасными для организма.

Одним из молекулярных маркеров клеточной пролиферации является белок PCNA (ядерный белок пролиферирующих клеток), экспрессия которого увеличивается в S1 фазу клеточного деления. Однако выявление этого маркера эффективно для пула быстроделющихся клеток, например, лимфоцитов, и малоинформативно для бета-клеток с медленными процессами деления. В последнем случае более эффективным было определение пролиферативной активности бета-клеток по результатам многодневного накопления бромдезоксисуридина (BrdU), который является аналогом урацила и накапливается в клетках, готовящихся к процессу деления.

Цель работы

Изучить особенности синтеза инсулина, экспрессии маркеров апоптоза и пролиферации бета-клеток в динамике экспериментального сахарного диабета у крыс.

Материалы и методы исследования

Исследования проведены на 30 самцах белых лабораторных крыс массой 160–230 г, которые разделены на 3 экспериментальные группы по 10 особей в каждой: 1 группу составляли интактные животные (контроль); во 2 и 3 группы вошли крысы с экспериментальным сахар-

ным диабетом (СД) длительностью 28 дней (группа 2) и 38 дней (группа 3). Сахарный диабет моделировали однократным внутрибрюшинным введением стрептозотоцина (Sigma Chemical, США) в дозе 50 мг/кг. Для определения пролиферативной активности эндокриноцитов всем животным ежедневно в течение 7 дней перед окончанием эксперимента вводили бромдезоксисуридин (BrdU) в дозе 40 мг/кг внутрибрюшинно. В крови всех крыс определяли уровень глюкозы с помощью глюкометра GlucoCard-II (Япония) и концентрацию инсулина с помощью иммуноферментного набора (DRG, США). Животных выводили из эксперимента декапитацией под наркозом. Поджелудочную железу фиксировали в растворе Буэна и после стандартной гистологической обработки заключали в парапласт (MkCormick, США). На микротоме Microm 235 (Германия) готовили 5-микронные срезы из различных участков поджелудочной железы, которые после депарафинизации и регидратации обрабатывали антителами к инсулину (Peninsula Lab. Inc., Великобритания), белку Bcl-2 (Santa Cruz, США), белку p53 (Santa Cruz, США), антителами к BrdU (Sigma, США). В качестве вторичных антител применяли IgG, конъюгированные с FITC (Sigma, США). Анализ иммунофлуоресцентной реакции анализировали на системе цифрового анализа изображения VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Германия). Полученные данные эксперимента обрабатывали пакетом прикладных и статистических программ VIDAS-2.5 (Kontron Elektronik, Германия) и Excell-2003 (США). Для оценки достоверности различий в группах применяли t-критерий Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Развитие СД приводило к закономерной гипергликемии, уровень которой к 38 дню развития патологического процесса увеличивался практически в 6 раз по отношению к контролю (табл. 1). При этом концентрация инсулина в крови снижалась на 70%.

Таблица 1

Динамика концентрации глюкозы и инсулина в плазме экспериментальных животных (M±m)

Биохимические показатели	Контроль	Диабет	
		28 дней	38 дней
Глюкоза, ммоль/л	4,02±0,15	13,21±1,48*	23,06±2,73**
Инсулин, мкМЕ/мл	8,718±0,63	5,992±0,339*	6,149±0,305**

Примечание: достоверные ($P < 0,05$) отличия по отношению к контролю (*) и к 28-дневному диабету (#).

При морфометрическом исследовании поджелудочной железы было установлено, что количество панкреатических островков (ПО) в ней к 38 дню течения СД уменьшалось примерно в 2 раза по отношению к показателям контрольных животных (табл. 2). При этом средняя площадь ПО уменьшалась на 45% по отношению к контролю. Подобные изменения обусловлены изменением цитоархитектоники ПО при диабете. Если у контрольных крыс в структуре ПО преобладали «малые» (площадью 180–1500 мкм²) и «средние» (площадью 1500–3500 мкм²) островки, на долю которых приходилось более 75%, то при развитии 28 дневного СД доля «малых», «средних», «больших» (площадью 3500–7500 мкм²) и «гигантских» (площадью более 7500 мкм²) ПО была примерно равной, а к 38 дню развития СД «малые» островки доминировали и их доля превышала 50%.

Таблица 2

Морфофункциональная характеристика панкреатических островков (M±m)

Показатели	Контроль	Диабет	
		28 дней	38 дней
Количество ПО / см ² среза железы	209±2	84±1*	116±1**
Количество бета-клеток / мм ² среза железы	52,1±3,9	12,3±0,6*	12,5±0,8*
Количество бета-клеток в островках	25±2	15±1*	11±1**
Площадь бета-клеток, мкм ²	86,8±2,7	157,0±8,3*	127,2±5,5**
Концентрация инсулина в бета-клетках, единиц иммунофлуоресценции	0,636±0,011	1,107±0,021*	1,041±0,016**
Содержание инсулина в ПО, единиц иммунофлуоресценции	1279±116	2560±190*	1129±76#

Примечание: достоверные ($P < 0,05$) отличия по отношению к контролю (*) и к 28-дневному диабету (#).

Известно, что в норме основную долю эндокриноцитов ПО составляют бета-клетки, синтезирующие инсулин, которые у контрольных крыс занимали 64,3±0,9% площади островка. Вместе с тем, к 38 дню течения СД доля материала, иммунореактивного к инсулину, в ПО увеличивалась до 69,9±1,1% ($p < 0,001$), притом, что количество бета-клеток в островках уменьшалось более чем в 2 раза (табл. 2). Это объяснялось компенсаторной гипертрофией бета-клеток при СД. Вместе с тем, учитывая снижение численности ПО при диабете, ожидаемым было четырехкратное снижение количества бета-клеток на единицу площади среза поджелудочной железы к 28 дню течения патологического процесса.

Следует отметить, что при уменьшении численности бета-клеток при СД инсулин-синтезирующая функция ПО компенсировалась не только за счет гипертрофии бета-клеток, но и за счет усиления синтеза инсулина в них. Об этом свидетельствовало повышение концентрации иммунореактивного инсулина в бета-клетках на 64–74% (табл. 2). Однако, если к 28 дню течения СД подобная гиперфункция бета-клеток приводила к 2-кратному увеличению содержания инсулина в ПО, то к 38 дню этот показатель уменьшался, что, по-видимому, свидетельствовало об истощении бета-клеток и приводило к дополнительному росту гликемии на 75%.

Идентификация маркеров апоптоза в ПО показала, что численность Vcl2-позитивных эндокриноцитов при диабете уменьшалась в 8 раз по сравнению с контролем, а p53-позитивных эндокриноцитов – в 4 раза, точно так же как и инсулин-позитивных бета-клеток (табл. 3). Вместе с тем, если соотношение численности p53-позитивных клеток к количеству бета-клеток при диабете не изменялось и составляло 24:100, то для Vcl2-позитивных эндокриноцитов это соотношение уменьшалось с 12:100 (в контроле) до 5:100. Полученные данные свидетельствуют о том, что при СД 1 типа механизмы аутоиммунной деструкции бета-клеток, по-видимому, не влияют на интенсивность естественного апоптоза эндокриноцитов, но в значительной мере угнетают синтез антиапоптотического белка Vcl-2.

Таблица 3

Количество иммунопозитивных клеток в панкреатических островках (M±m)

Количество клеток / см ² среза железы	Контроль	Диабет	
		28 дней	38 дней
Инсулин-позитивные	5209±389	1234±69*	1253±84*
Vcl-2-позитивные	626±5 12,01±0,09	58±1* 4,70±0,08*	57±2* 4,54±0,15*
p53-позитивные	1257±8 24,13±0,15	267±3* 21,63±0,24*	300±10** 23,94±0,79#
BrdU-позитивные	988±5 18,96±0,09	123±2* 9,96±0,16*	276±3** 22,02±0,23**

Примечание: в числителе приведены абсолютные, а в знаменателе – удельные показатели; достоверные ($P < 0,05$) отличия по отношению к контролю (*) и к 28-дневному диабету (#).

Изучение пролиферативной активности эндокриноцитов ПО показало, что к 28 дню течения СД численность BrdU-позитивных клеток снижалась в 8 раз по отношению к контрольным показателям, однако в дальнейшем их количество удваивалось и составляло 28% от уровня контроля. Возможно, эти данные свидетельствуют о компенсаторной активации пролиферации внутриостровковых эндокриноцитов к 38 дню течения СД, а также об усилении новообразования бета-эндокриноцитов из клеток протокового эпителия.

Выводы

1. Развитие сахарного диабета приводит к снижению численности бета-клеток в островках и в поджелудочной железе в целом. При этом оставшиеся бета-клетки компенсаторно гипертрофируются, и в них увеличивается концентрация инсулина.

2. При диабете удельные показатели синтеза проапоптотического белка p53 практически не изменяются, однако в значительной мере снижается выработка антиапоптотического белка Vcl-2.

3. Развитие диабета приводит к существенному снижению пролиферативной активности эндокриноцитов панкреатических островков.

Литература

1. Apoptosis / [Dimatteo, M.A., Loweth, A.C., Thomas, S., Mabley, J.G., Morgan, N.G., Thorpe, J.R., and Green, I.C.] – 1997. – №2. – P. 164–177.
2. Gordon V. Diabetes Voice / Gordon V. 2008. – Vol. 53, №2.
3. Самуилов В.Д. Программированная клеточная гибель / В.Д. Самуилов, А.В. Алескин, Е.М. Лагунова. // Биохимия. – 2000. – Т. 65, Вып. 8. – С. 1029–1046.
4. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity / [Bourdon J.-C., Fernandes K., Murray-Zmijewski F., Liu G., Diot A., Xirodimas D.P., Saville M.K., Lane D.P.] // Genes & Dev. – 2005. – №19. – P. 2122–2137.
5. Колесник Ю.М. Состояние островкового аппарата поджелудочной железы при экспериментальном сахарном диабете различной степени тяжести / Ю.М. Колесник, А.В. Абрамов, Г.В. Василенко. // Арх. патологии. – 1992. – Т. 54, №12. – С. 24–27.
6. International Diabetes Federation. Diabetes atlas. [Электронный ресурс] – 2007. – № 3. – Режим доступа: <http://www.eatlas.idf.org/>
7. Duvillie B. Increased islet cell proliferation, decreased apoptosis, and greater vascularization leading to beta-cell hyperplasia in mutant mice lacking insulin / Duvillie B., Currie C., Chrones T. et al. // Endocrinology. – 2002. – Vol. 143, №4. – P. 1530–1537.
8. Bishop A.E. The anatomy, organization and ultrastructure of the islets of Langerhans / Bishop A.E., Polak J.M., Pickup J.C. et al. // Blackwell Science. – 2002. – P. 10.1–10.6.
9. Elliot J.I. Streptozotocin-induced diabetes in mice lacking $\alpha\beta$ T cells / Elliot J.I., Dewchand H., Altmann D. M // Clin. Exp. Immunol. – 1997. – Vol. 109. – P. 116–120.
10. Колесник Ю.М. Изменения эндокринной части поджелудочной железы белых лабораторных крыс при сахарном диабете, адаптации к гипоксии и их сочетании (иммуноцитохимическое исследование) / Ю.М. Колесник, А.В. Абрамов, Г.В. Василенко // Морфология. – 1996. – №1. – С. 91–94.

Сведения об авторах:

Иваненко Т. В., ст. лаборант каф. патофизиологии ЗГМУ.
 Абрамов А. В., д. мед. н., профессор каф. патофизиологии ЗГМУ.
 Колесник Ю. М., д. мед. н., профессор, ректор ЗГМУ, зав. каф. патофизиологии ЗГМУ.
 Василенко Г. В., к. мед. н., доцент каф. патофизиологии ЗГМУ.

Адрес для переписки:

Иваненко Тарас Васильевич. 69035, г. Запорожье, пр. Маяковского, 26, ЗГМУ, каф. патофизиологии.
 Тел.: (0612) 34 35 61. E-mail: IvanenkoTV@i.ua;