

УДК 616.379-018.1-092:616.379-008.64:616-008.922.1«735»

© Коллектив авторов, 2012.

## ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ПОВРЕЖДЕНИЙ БЕТА-КЛЕТОК ПАНКРЕАТИЧЕСКИХ ОСТРОВКОВ ПРИ ДИАБЕТЕ И ВЛИЯНИЕ ПЕРЕРЫВИСТОЙ ГИПОКСИИ

**Ю.М. Колесник, А.В. Абрамов, Т.В. Иваненко, В.А. Жулинский***Запорожский государственный медицинский университет, кафедра патофизиологии (зав. – проф. Ю.М. Колесник), г. Запорожье.*

### **PATHOGENETIC MECHANISMS OF DAMAGED BETA-CELLS OF THE PANCREATIC ISLETS WITH DIABETES AND THE IMPACT OF INTERMITTENT HYPOXIA**

**Yu.M. Kolesnik, A.V. Abramov, T.V. Ivanenko, V.A. Zhulinsky**

#### SUMMARY

At rats with an experimental diabetes and influence on intermittent hypoxia, features of synthesis of insulin, cells-architectonics beta-cells and an expression of markers apoptotic and proliferative are studied. Amount beta-cells increase, and concentration of insulin remains border of a control indicator. The production of anti-apoptotic protein Bcl2 increase to a considerable extent. Intermittent hypoxia significantly increase the proliferative activity endokrinotsitis pancreatic islets.

### **ПАТОГЕНЕТИЧНІ МЕХАНІЗМИ ПОШКОДЖЕННЯ БЕТА-КЛІТИН ПАНКРЕАТИЧНИХ ОСТРІВЦІВ ПРИ ДІАБЕТІ І ВПЛИВ ПЕРЕРИВЧАСТОЇ ГІПОКСІЇ**

**Ю.М. Колесник, А.В. Абрамов, Т.В. Иваненко, В.О. Жулинський**

#### РЕЗЮМЕ

У щурів з експериментальним цукровим діабетом та впливом на них переривчастої гіпоксії вивчені особливості синтезу інсуліну, цитоархітекtonіки бета-клітин та експресія маркерів апоптозу та проліферації. Кількість бета-клітин підвищується, концентрація інсуліну залишається в межах інтактного показника. Значною мірою підвищується вироблення антиапоптотичного білку Bcl2. Гіпокситерапія призводить до суттєвого підвищення проліферативної активності ендокриноцитів панкреатичних острівців.

**Ключевые слова:** поджелудочная железа, сахарный диабет, гипоксические тренировки, апоптоз, пролиферация.

В патогенезе сахарного диабета 1-го типа (СД) центральное место занимает недостаточность бета-клеток островкового аппарата поджелудочной железы, которая характеризуется недостаточной выработкой инсулина. При этом у больных СД в островках отмечается специфическая прогрессирующая аутоиммунная деструкция бета-клеток, гибель которых происходит путём некробиоза и апоптоза [6, 8]. У крыс со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом наблюдается развитие стойкой гипергликемии, уровень которой в течении месяца развития патологического процесса увеличивается свыше 20 ммоль/л при снижении концентрации инсулина в крови на 30% [2]. Следует отметить, что у крыс с СД в крови в 3,5 раза повышается уровень кортикостерона, что усиливает гипергликемию за счет активации глюконеогенеза в печени [1]. Вместе с тем очевидно, что характер течения СД зависит не только от интенсивности процессов гибели бета-клеток, но и от скорости их пролиферации и дифференцировки из клеток протокового эпителия [3, 5, 7].

Целью исследования стало установить изменение функционального состояния бета-клеток панкреатических островков при экспериментальном

сахарном диабете и воздействии на организм прерывистой гипоксии.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на 90 самцах белых лабораторных крыс массой 160-230 г, которые были разделены на 6 экспериментальных групп по 15 особей в каждой: 1 группу составили интактные животные; 2-6 группы составили крысы с экспериментальным сахарным диабетом (СД) продолжительностью 28 дней (группы 2 и 3), 38 дней (группы 4 и 5) и 58 дней (группа 6). Сахарный диабет моделировали однократным внутривенным введением стрептозотоцина (Sigma Chemical, США) в дозе 50 мг/кг. В эксперимент включали животных, у которых на 10 сутки после индукции диабета отмечалась гипергликемия >9 ммоль/л. Диабетических животных 3,5 и 6 групп с 14 по 28 день развития патологии подвергали влиянию прерывистой гипоксии, которую моделировали с помощью барокамеры. Животных удерживали на протяжении 6 часов ежедневно на фиксированной высоте подъема: с 1 по 5 дни адаптировали на высотах от 1000 м до 5000 м над уровнем моря, а последующие 10 дней - на высоте 6000 м, что соответствует

концентрации кислорода в воздухе 9,8% ( $pO_2=74,2$  мм Hg). Для определения пролиферативной активности эндокриноцитов всем животным ежедневно в течение 7 дней перед окончанием эксперимента вводили 5-бромдезоксисуридин (BrdU) (Sigma, США) в дозе 40 мг / кг внутривенно.

Крыс 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 H235 (Германия) готовили 5-микронные срезы из различных участков поджелудочной железы, которые после депарафинизации и регидратации обрабатывали антителами к инсулину (Peninsula Lab. Inc., Великобритания), к белку Bcl-2 (Santa Cruz, США) для изучения антиапоптотической активности, к белку p53 (Santa Cruz, США) для изучения проапоптотической активности, к BrdU (Sigma, США) для изучения пролиферативной активности. В качестве вторичных антител использовали IgG, конъюгированные с FITC (Sigma, США). Анализ иммунофлуоресцентной реакции проводили на системе цифрового анализа изображения VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Германия) с помощью флуоресцентного микроскопа Axioskop, оснащенного высокоэmissionsонным светофильтром 38HE и видеокамерой AxioCam HRm (Zeiss, 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 использовали t-критерий Стьюдента ( $Pst<0,05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При обзорной микроскопии препарата ткани поджелудочной железы у крыс с СД наблюдалась морфологическая картина деструктивного процесса с зонами некроза и утратой плотных контактов между островковыми клетками. При этом отмечалось выраженное уменьшение размеров панкреатических островков, в структуре которых преобладали маленькие островки площадью до 1500 мкм<sup>2</sup>. Развитие СД приводило к уменьшению количества бета-клеток как в самих островках, так и их удельной численности в поджелудочной железе (табл. 1). Изучение пролиферативной активности эндокриноцитов поджелудочной железы показало, что численность BrdU-позитивных клеток в эндокринной части железы снижалась в 8 раз по отношению к контрольным показателям (табл. 1). При этом обращало внимание то обстоятельство, что и индекс пролиферативной активности бета-эндокриноцитов уменьшался практически вдвое (табл. 2). Идентификация антиапоптотического маркера – белка Bcl-2, показала, что численность Bcl2 иммунопозитивных эндокриноцитов уменьшалась более чем в 10 раз по сравнению с показателем у интактных животных (табл. 1). Сходную динамику демонстрировал и индекс антиапоптотической активности, который уменьшался в 2,5 раза (табл. 2). Численность эндокриноцитов, экспрессирующих проапоптотический белок p53, уменьшалась более чем в 4,5 раза по сравнению с показателем у интактных животных (табл. 1), хотя индекс проапоптотической активности бета-эндокриноцитов существенно не изменялся (табл. 2).

Таблица 1  
Количество иммунопозитивных клеток в панкреатических островках при гипоксических тренировках крыс с экспериментальным диабетом ( $M \pm m$ )

Количество клеток / см <sup>2</sup> среза железы	Интактные	Диабет		
		28 дней <sup>(1)</sup>	38 дней <sup>(2)</sup>	58 дней <sup>(3)</sup>
Инсулин-иммунопозитивные	5209±389	$\frac{2156 \pm 120^*}{1234 \pm 69}^{(2)}$	$\frac{3100 \pm 201^{*(1),(3)}}{1253 \pm 84}$	$\frac{2321 \pm 162}{1253 \pm 84}^{(2)}$
BrdU- иммунопозитивные эндокриноциты	988±5	$\frac{318 \pm 2^{*(2),(3)}}{123 \pm 2}$	$\frac{605 \pm 3^{*(1),(3)}}{276 \pm 3}$	$\frac{641 \pm 4}{276 \pm 3}^{(1),(2)}$
Bcl2- иммунопозитивные эндокриноциты	626±5	$\frac{249 \pm 4^{*(2),(3)}}{58 \pm 1}$	$\frac{471 \pm 3^{*(1),(3)}}{57 \pm 1}$	$\frac{324 \pm 4}{57 \pm 1}^{(1),(2)}$
p53- иммунопозитивные эндокриноциты	1257±8	$\frac{697 \pm 8^{*(2),(3)}}{267 \pm 3}$	$\frac{515 \pm 4^{*(1),(3)}}{300 \pm 10}$	$\frac{485 \pm 4}{300 \pm 10}^{(1),(2)}$

Примечания: в знаменателе приведены показатели контрольных крыс (без ГТ); достоверные ( $Pst<0,05$ ) отличия по отношению к показателям контрольных диабетических крыс (\*), и к соответствующему сроку течения диабета<sup>(1), (2), (3)</sup>.

Полученные данные свидетельствуют о том, что при развитии СД в эндокриноцитах отмечается изменение экспрессии белков апоптоза с повышением индекса апоптоза, что свидетельствует об активации данного механизма гибели бета-клеток

при диабете (табл. 2). Примечательным является тот факт, что развитие СД приводит к временному уменьшению индекса пролиферативной активности бета-клеток с последующим его увеличением, что можно рассматривать как механизм компенсации,

Таблица 2

**Индексы активности молекулярных маркеров в панкреатических островках при гипоксических тренировках крыс с экспериментальным диабетом (M±m)**

Индекс	Интактные	Диабет		
		28 дней <sup>(1)</sup>	38 дней <sup>(2)</sup>	58 дней <sup>(3)</sup>
пролиферативной активности	18,97±0,10	14,78±0,10 <sup>*,(2),(3)</sup> 9,96±0,16	19,52±0,12 <sup>*,(1),(3)</sup> 22,02±0,23	22,63±0,19 <sup>(1),(2)</sup>
антиапоптотической активности	12,02±0,09	11,55±0,21 <sup>*,(2),(3)</sup> 4,70±0,08	15,21±0,10 <sup>*,(1),(3)</sup> 4,54±0,15	13,99±0,18 <sup>(1),(2)</sup>
проапоптотической активности	24,12±0,15	32,34±0,41 <sup>*,(2),(3)</sup> 21,63±0,22	16,62±0,15 <sup>*,(1),(3)</sup> 23,94±0,83	20,90±0,19 <sup>(1),(2)</sup>
апоптоза	2,000±0,012	2,800±0,042 <sup>*,(2),(3)</sup> 4,584±0,055	1,092±0,010 <sup>*,(1),(3)</sup> 5,230±0,221	1,494±0,015 <sup>(1),(2)</sup>

Примечания: в знаменателе приведены показатели контрольных крыс (без ГТ); достоверные ( $Pst < 0,05$ ) отличия по отношению к показателям контрольных диабетических крыс (\*), и к соответствующему сроку течения диабета <sup>(1), (2), (3)</sup>.

направленный на восстановление численности бета-эндокриноцитов в условиях их прогрессирующей гибели.

Одним из факторов, способным воздействовать на функциональное состояние бета-клеток при СД, является действие прерывистой гипоксии (ПГ). Ранее нами было показано, что многодневные гипоксические тренировки приводили к замедлению роста гипергликемии и появлению в ацинарной ткани отдельных бета-клеток, не формирующих островка [4]. Дальнейшие наши исследования показали, что эффект ПГ у животных с СД сохраняется и после прекращения гипоксических тренировок [1].

В результате 15-дневного влияния ПГ у животных с СД увеличивалось среднее количество бета-клеток в островках и на 38% нарастала их удельная численность в поджелудочной железе по сравнению с контрольными крысами с СД. При этом в крови экспериментальных животных концентрация глюкозы снижалась на 16% ( $Pst < 0,05$ ), концентрация кортикостерон - на 27% ( $Pst < 0,05$ ), а уровень инсулина увеличивался на 40% ( $Pst < 0,05$ ). В поджелудочной железе под влиянием ПГ увеличивалась численность BrdU-позитивных бета-эндокриноцитов и на 50% нарастал индекс их пролиферативной активности (табл. 1,2). Более чем в 3 раза увеличивалось количество Vcl2иммунопозитивных бета-эндокриноцитов и в 1,5 раза нарастал индекс антиапоптотической активности. Хотя численность бета-эндокриноцитов, экспрессирующих проапоптотический белок p53, увеличивалась более чем в два раза, а индекс проапоптотической активности повышался на 52%, индекс апоптоза бета-эндокриноцитов уменьшался на 63%.

С теоретической и практической точки зрения важным аспектом действия ПГ является продолжительность её саногенного эффекта после окончания гипоксических тренировок. Наблюдение за экспериментальными животными в течение 30

дней после окончания действия ПГ показали, что численность бета-клеток в поджелудочной железе крыс с СД не уменьшалась, при этом концентрация глюкозы в крови не превышала 14,0 ммоль/л, а уровень инсулина составлял 9,4 мкМЕ/мл. Важно отметить, что в постгипоксический период уровень пролиферативной активности бета-эндокриноцитов продолжал увеличиваться, а индекс антиапоптотической активности в 2 раза превышал показатели контрольных крыс с СД (табл. 2). Численность эндокриноцитов, экспрессирующих проапоптотический белок p53 уменьшалась на 35% ( $Pst < 0,05$ ) по сравнению с показателем у животных на момент окончания ПГ, а индекс проапоптотической активности бета-эндокриноцитов уменьшился практически вдвое. В результате через 10 дней после окончания действия ПГ индекс апоптоза становился в 5 раз меньше, чем у контрольных диабетических животных.

Таким образом 15-дневное воздействие ПГ на диабетических животных приводит к увеличению численности бета-эндокриноцитов за счет активации их пролиферации и торможения процессов апоптоза, что обеспечивает увеличение продукции инсулина поджелудочной железой и эффективно снижает уровень гликемии. При этом саногенная направленность эффектов прерывистой гипоксии сохраняется в течение месяца после окончания гипоксических тренировок.

#### ВЫВОДЫ

1. Развитие диабета у крыс приводит к уменьшению численности бета-клеток на фоне повышения индекса апоптоза эндокриноцитов, которое не компенсируется ростом их пролиферативной активности.

2. Прерывистая гипоксия стимулирует синтез антиапоптотического белка Vcl2 в бета-клетках, активизирует их пролиферативную активность, что приводит к увеличению количества бета-

эндокриноцитов в поджелудочной железе и снижению уровня гликемии у крыс с экспериментальным диабетом.

3. Саногенные эффекты прерывистой гипоксии на эндокринную функцию поджелудочной железы сохраняются на протяжении 30-ти дневного постгипоксического периода.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Абрамов А.В., Колесник Ю.М., Иваненко Т.В. Вплив переривчастої гіпоксії на функціональний стан бета-клітин панкреатичних острівців при експериментальному цукровому діабеті // Здобутки клінічної і експериментальної медицини. – 2011. – № 2 (13). – С. 10–13.

2. Иваненко Т.В. А.В. Абрамов, Ю.М. Колесник и др. Эндокринный статус и уровень экспрессии белков Bcl-2 и p53 в панкреатических островках у крыс с экспериментальным сахарным диабетом // Патологія – 2011. – Т.8, № 2. – С. 18-20.

3. Кирик О. В. Маркеры пролиферации, применяемые в гистологических исследованиях // Морфология. – 2009. – № 6. – С. 95–100.

4. Колесник Ю.М., Абрамов А.В. Вплив гіпоксичної гіпоксії на стан ендокринної функції підшлункової залози щурів // Фізіолог. журн. -1992. 38, №3. - с.60-63.

5. Porter J. R. T.G. Barrett. Monogenic syndromes of abnormal glucose homeostasis: clinical review and relevance to the understanding of the pathology of insulin resistance and b cell failure // J. Med. Genet. - 2005. - Vol. 42. - P. 893–902.

6. Kaminitz A., Stein J., Yaniv I. et al. The vicious cycle of apoptotic beta-cell death in type 1 diabetes // Immunol. Cell. Biol. – 2007. – Vol. 85. – P. 582-589.

7. Gordon V. Diabetes Voice // Immunol. Cell. Biol. – 2008. – Vol. 90. – P. 53.

8. Conceptual Model of Symptom-Focused Diabetes Care for African Americans / A. H. Skelly, J. Leeman, J. Carlson [et al.] // J. Nurs. Scholarsh. – 2009. – Vol. 40, N 3. – P. 261–267.