

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 внутривентральным 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 высокоэmissionным 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 мкм². 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 ² среза железы	Интактные	Диабет		
		28 дней ⁽¹⁾	38 дней ⁽²⁾	58 дней ⁽³⁾
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	$\frac{318 \pm 2^{*(2),(3)}}{123 \pm 2}$	$\frac{605 \pm 3^{*(1),(3)}}{276 \pm 3}$	$\frac{641 \pm 4^{(1),(2)}}{276 \pm 3}$
Bcl2- иммунопозитивные эндокриноциты	626±5	$\frac{249 \pm 4^{*(2),(3)}}{58 \pm 1}$	$\frac{471 \pm 3^{*(1),(3)}}{57 \pm 1}$	$\frac{324 \pm 4^{(1),(2)}}{57 \pm 1}$
p53- иммунопозитивные эндокриноциты	1257±8	$\frac{697 \pm 8^{*(2),(3)}}{267 \pm 3}$	$\frac{515 \pm 4^{*(1),(3)}}{300 \pm 10}$	$\frac{485 \pm 4^{(1),(2)}}{300 \pm 10}$

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^{(1), (2), (3)}.

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

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 Vcl2 иммунопозитивных 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, активирует 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.