

ВЛИЯНИЕ ГИМНЕМОВЫХ КИСЛОТ НА ГИБЕЛЬ И РЕПАРАЦИЮ β-ЭНДОКРИНОЦИТОВ ПРИ СТРЕПТОЗОТОЦИН-ИНДУЦИРОВАННОМ ДИАБЕТЕ

В. Б. Писарев, Г. Л. Снигур, А. А. Спасов*, М. П. Воронкова*, А. Е. Буланов**

Кафедра патологической анатомии, кафедра фармакологии ВолГМУ, лаборатория морфологии и иммуногистохимии Волгоградского научного центра РАМН, Российский НИИ Здоровья, Москва***

Введение экстракта гимнемовых кислот предотвращает повреждение β-эндокриноцитов панкреатических островков при стрептозотоцин-индуцированном диабете. Гимнемовы кислоты частично ингибируют апоптоз и ускоряют процессы репаративной регенерации β-эндокриноцитов.

Ключевые слова: сахарный диабет, β-эндокриноциты, апоптоз, регенерация, стрептозотоцин.

THE INFLUENCE OF GYMNEMAACIDS ON CELL DEATH AND REPARATION OF β-CELLS ON STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES MELLITUS

V. B. Pisarev, G. L. Snigur, A. A. Spasov, M. P. Voronkova, A. E. Bulanov

Inoculation of Gymnema acids extract prevents damage of pancreatic islets of β-cells in models of streptozotocin-induced diabetes mellitus. Gymnema acids partially inhibit apoptosis and increase regeneration of β-cells.

Key words: diabetes mellitus, pancreatic β-cells, apoptosis, regeneration, streptozotocin.

Ранняя инвалидизация и высокая летальность от поздних осложнений возводят сахарный диабет (СД) в ранг глобальной медико-социальной проблемы здравоохранения многих стран мира [3]. Одним из приоритетных направлений современной фармакологии является создание новых антидиабетических средств. При этом существующий алгоритм лечения СД, особенно II типа, не всегда является оптимальным способом коррекции гипергликемии и развития осложнений. Ведется активный поиск гипогликемических препаратов с новыми механизмами действия: секретогенов, сенситайзеров инсулина, ингибиторов скорости продукции глюкозы печенью и др. Одним из перспективных направлений является поиск модуляторов инкретинов: GIP (глюкозозависимый инсулинотропный полипептид) и GLP-1 (глюкагоноподобный пептид-1), которые регулируют активность секреции β-клеток путем оптимизации синтеза инсулина и способствуют пролиферации β-клеток, новообразованию панкреатических островков, а также угнетают апоптоз. Установлено, что некоторые растительные экстракты, в частности гимнемы лесной (*Gymnema sylvestre*), обладают выраженными гипогликемическими свойствами [4].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучение лекарственного патоморфоза и особенностей репаративной регенерации β-эндокриноцитов панкреатических островков при их повреждении стрептозотоцином на фоне введения гимнемовых кислот.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводили на белых крысах-самцах, массой 300—340 г, разделенных на группы: 1 — интактная ($n = 10$), 2 — стрептозотоцин-индуцирован-

ный СД ($n = 10$) и 3 — стрептозотоцин-индуцированный СД на фоне введения гимнемовых кислот ($n = 10$). Во 2-й и 3-й опытных группах моделировали тяжелый СД (глюкоза крови выше 15 ммоль/л) ежедневным в/в введением стрептозотоцина (Sigma) в дозе 20 мг/кг в течение 5 дней. В 3-й группе перорально вводили экстракт гимнемовых кислот в дозировке 280 мг/кг, 2 раза/сутки. Животные контрольной группы и с моделью СД получали питьевую отстоянную воду в аналогичном объеме (протокол экспериментальной части исследования согласован с Региональным этическим комитетом, решение № 43-2006). Спустя три недели, соблюдая принципы гуманного отношения, животных выводили из эксперимента. Ткань поджелудочной железы фиксировали в течение 24 часов в 10%-м растворе нейтрального забуференного формалина (pH 7,4) и заливали в парафиновые блоки. На роторном микротоме изготавливали серийные срезы толщиной 5—6 мкм. Производили окрашивание гематоксилином и эозином по общепринятой гистологической методике [5]. Для иммуногистохимического исследования использовали поликлональные антитела к инсулину (DakoCytomation), протеинам p53 (DakoCytomation) и Bax (BD Pharmingen); моноклональные антитела к ядерному антигену пролиферирующих клеток — PCNA (клон PC10), к белку Ki-67 (клон MIB-5), к каспазе 3 (клон JHM62, Novocastra), к рецептору TRAIL — родственный фактору некроза опухоли апоптоз-индуцирующий лиганд (клон 27B12, Novocastra), белку MDM2 (клон 1B10, Novocastra) и протеину Bcl2 (клон sc-7382, Santa Cruz). Иммуногистохимическое исследование проводили по протоколу фирм производителей (HIER) с использованием систем детекции «LSAB» и «En Vision» и хромогеном — диаминобензидином. Характер иммуногисто-

химической реакции оценивали визуально в баллах с учетом интенсивности окраски и количества окрашенных клеток по шкале Allred D. C., et al. (1998).

Морфометрический анализ проводили с помощью программы анализа изображений «ВидеоТест-Морфо-4». Определяли индексы апоптоза и пролиферации (число β -клеток панкреатических островков с признаками апоптоза и пролиферации на 100 %). Статистическую обработку данных проводили в программе «MS Excel» с расчетом базовых статистических показателей (M , m) и использованием парного t -критерия Стьюдента при достоверности $p < 0,05$ [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В контрольной группе отмечалось типичное гистологическое строение поджелудочной железы. В панкреатических островках β -эндокриноциты располагались преимущественно в центре. Выявлялась выраженная цитоплазматическая экспрессия инсулина. В отдельных β -клетках отмечалась слабая или умеренная ядерная экспрессия факторов пролиферации: PCNA-позитивные клетки составляли 3 %, Ki-67-позитивные — 1,5 %. Экспрессия Вах была негативной во всех клетках. Определялось слабое позитивное цитоплазматическое окрашивание к протеину Bcl-2. В ядрах единичных β -клеток определялась слабая экспрессия белка p53. Большинство ядер β -клеток позитивно окрашивались антителами к белку MDM2. Цитоплазматическая экспрессия каспазы 3 и TRAIL носила слабо выраженный характер в единичных β -эндокриноцитах (табл. 1). Апоптотический индекс составлял 4,1 % (табл. 2).

У крыс со стрептозототин-индуцированным СД определялся выраженный отек междольковой соединительной ткани и полнокровие кровеносных капилляров. В коллабированных панкреатических островках отмечалась умеренная лимфоцитарная инфильтрация. В большинстве островков отмечались выраженные деструктивные изменения β -клеток и разрастание соединительной ткани. Инсулин-позитивные клетки располагались поодиночке или в виде мелких скоплений в центральных отделах островков. Отмечалась их гипертрофия с выраженной экспрессией инсулина и умеренной экспрессией факторов пролиферации: PCNA-позитивные клетки составляли 9 %, Ki-67-позитивные — 2,3 %. Экспрессия протеинов p53, Вах, MDM2 и Bcl-2 была слабая в единичных клетках. Отмечалась выраженная экспрессия TRAIL и каспазы 3 в большинстве β -эндокриноцитов (табл. 1). Происходило достоверное увеличение β -эндокриноцитов, находящегося в состоянии апоптоза, по сравнению с контрольной группой животных (табл. 2).

В группе животных со стрептозототин-индуцированным СД, получавших экстракт гимномовых кислот, в панкреатических островках сохранялась умеренная лимфоцитарная инфильтрация, полнокровие

капилляров и деструктивные изменения β -эндокриноцитов. Единичные островки были полностью склерозированы. Отмечалась умеренно выраженная гипертрофия β -эндокриноцитов центральных отделов островков с выраженной экспрессией инсулина. Мелкие островки без признаков воспаления и деструкции располагались в тесной связи с выводными протоками. Среди ацинарных клеток определялись единичные инсулин-позитивные клетки или их скопления. Экспрессия факторов пролиферации носила выраженный характер: PCNA-позитивные клетки составляли 13,1 %, Ki-67-позитивные — 3,2 %. Также отмечались PCNA-позитивные и Ki-67-позитивные клетки эпителия протоков и единичные клетки, расположенные в ацинарной ткани и в непосредственной близости от островков. Экспрессия протеинов p53, Bcl-2 была слабая и Вах негативная. Умеренная экспрессия протеина MDM2 отмечалась в большинстве клеток островков Лангерганса. Экспрессия каспазы 3 и TRAIL отмечалась в единичных β -эндокриноцитах (табл. 1). Количество β -клеток в состоянии апоптоза по сравнению с животными с СД достоверно уменьшалось (табл. 2).

Таблица 1

Иммуногистохимические характеристики β -эндокриноцитов по Allred D. C., et al. (1998)

	Интенсивность экспрессии			Количество клеток		
	Интakтная	СД	СД + ГК	Интakтная	СД	СД + ГК
Инсулин	+++	+++	+++	+++	+	++
p53	-	+	+	-	+	+
PCNA	+	++	+++	+	+	++
Ki-67	+	++	+++	+	+	++
Каспаза 3	+	+++	++	+	++	+
TRAIL	+	+++	++	+	++	+
Вах	-	+	-	-	+	-
Bcl2	+	-	+	+	-	+
MDM2	++	+	++	+++	+	++

Таблица 2

Индексы апоптоза и пролиферации β -эндокриноцитов

Группы	Пролиферативный индекс по PCNA, %	Пролиферативный индекс по Ki-67, %	Апоптотический индекс
Интakтная	3,0 $\pm$ 0,2	1,5 $\pm$ 0,3	4,1 $\pm$ 0,2
СД	10,1 $\pm$ 0,7*	2,3 $\pm$ 0,1*	35,2 $\pm$ 2,9*
СД + ГК	13,1 $\pm$ 1,9	3,2 $\pm$ 0,2**	13,3 $\pm$ 1,1**

* Достоверно по отношению к интактной группе;

** достоверно по отношению к группе с СД.

Известно, что при токсическом действии стрептозототина на β -клетки происходит фрагментация ДНК в результате ее алкилирования, а также образование токсических соединений — супероксид аниона, пероксинитрита и оксида азота. Грубые необратимые повреждения ДНК и внутриклеточных структур сопровождаются развитием некроза β -эндокриноцитов. Наравне с деструктивными изменениями в островках Лангерганса удается обнаружить активацию запрограммированной клеточной гибели, так

называемый апоптоз, пусковым моментом которого служат нелетальные повреждения ДНК, повреждение мембран митохондрий и действие на клетку внешних стимулов [9].

Вне зависимости от причины активации апоптоза ключевое место в его развитии занимает семейство цистеиновых протеаз, так называемые каспазы, которые образуют разветвленный каскад, взаимно активируя друг друга. В результате взаимодействия каспазного каскада активируется эффекторная каспаза 3, которая вызывает расщепление внутриклеточных белков и влечет гибель клетки [6, 8]. Выраженность апоптотического индекса и распространенность площади некрозов позволяют оценить степень повреждения ткани поджелудочной железы и наравне с биохимическими показателями (уровень гликемии, гликозилированный гемоглобин и др.) могут служить критерием степени тяжести экспериментального СД.

Расчет индекса пролиферации выявил достаточно низкую активность β -эндокриноцитов в контрольной группе животных, что согласуется с литературными данными о медленном обновлении клеточной популяции островков Лангерганса [2]. При моделировании СД и гибели большей части β -клеток достоверное увеличение индекса пролиферативной активности обусловлено активацией репаративных процессов. Из экспериментальных данных следует, что гимнемовы кислоты обладают выраженным стимулирующим действием на процессы клеточной репарации, что вполне согласуется с опытом зарубежных исследователей. Пролiferация не только островковых β -клеток, но и экспрессия маркеров клеточного деления в ацино-инсулярных клетках и клетках эпителия протоков рассматривается как активация клеток предшественников β -эндокриноцитов [11]. Однако вопрос о существовании клеток предшественников эндокриноцитов по-прежнему остается открытым. Ряд исследователей рассматривают в качестве таких клеток камбиальные клетки протоков поджелудочной железы [7]. Другие считают, что клетки предшественники эндокриноцитов присутствуют не только в системе протоков поджелудочной железы, но также определяются вокруг островков и способны трансдифференцироваться в β -эндокриноциты. Эти клетки встречаются крайне редко — 1 клетка на 3000—9000 клеток, и их гистогенез остается не выясненным [11].

Экспрессию ядерного антигена пролиферирующих клеток не всегда можно рассматривать как достоверный признак пролиферации, так как данный антиген обладает продолжительным периодом разрушения (около 20 часов) и экспрессируется в G0 фазе клеточного цикла и при репарации ДНК клеток [10]. В связи с этим более достоверным для расчетов индекса пролиферации следует считать экспрессию протеина Ki-67.

Усиление репаративных процессов β -клеток, обусловленное введением гимнемовых кислот, объясняется наличием инкретиномиметического эффекта, то есть стимуляцией GLP-1, который, как известно, регулирует баланс клеточной популяции островков Лангерганса за счет активации пролиферации и угнетения апоптоза. Однако конкретный механизм регуляции численности эндокриноцитов остается до конца не выясненным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, пероральное введение гимнемовых кислот у крыс с экспериментальным СД не препятствует развитию деструктивных изменений в β -эндокриноцитах. Выявленные особенности патоморфоза стрептозотоцин-индуцированного СД и репаративных процессов обусловлены инкретиноподобным действием гимнемовых кислот. Введение гимнемовых кислот существенно замедляет апоптоз, а также активирует репаративную регенерацию β -клеток при экспериментальном сахарном диабете.

ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г. Г. Основы количественной патологической анатомии. — М.: Медицина, 2002. — 240 с.
2. Акмаев И. Г. Руководство по гистологии (частная гистология органов и тканей) / Под ред. И. Г. Акмаева, В. Л. Быкова, О. В. Волкова. — В 2 т. — СПб: СпецЛит. — 2001. — 735 с.
3. Балаболкин М. И., Клебанова Е. М., Кремская В. М. Лечение сахарного диабета и его осложнений. Руководство для врачей. — М.: Медицина. — 2005. — 511 с.
4. Воронкова М. П. Противодиабетическая активность гимнемовых кислот: автореф. дис. ... доктора биол. наук. — Волгоград. — 2009. — 46 с.
5. Коржевский Д. Э. Краткое изложение основ гистологической техники для врачей и лаборантов-гистологов. — СПб. — 2005. — 48 с.
6. Мушамбаров Н. Н., Кузнецов С. Л. Молекулярная биология. — М.: «МИА». — 2003. — 544 с.
7. Drucker D. J. // Endoc. — 2003. — Vol. 144, № 1. — P. 5145—5148.
8. Nakayama T., Hattori M., Uchida K., et al. // Biochem J. — 2004. — Vol. 377, № 2. — P. 299—307.
9. Szkudelski T. // Physiol. Res. — 2001. — Vol. 50, № 6. — P. 536—546.
10. Tirakotai W., Bian L. G., Bertalanffy H., et al. // Chinese Medical Journal. — 2004. — Vol. 117, № 12. — P. 1815—1820.
11. Trucco M. // J. Clin. Investigation. — 2005. — Vol. 115, № 1. — P. 5—12.

Контактная информация:

Снигур Григорий Леонидович — к. м. н., доцент кафедры патологической анатомии с секционным курсом и курсами патологии и морфологии ВолГМУ, innov_volgmed@mail.ru