
МОРФОЛОГИЯ

В. Б. Писарев, Г. Л. Снигур, А. А. Спасов*, М. П. Самохина*

Кафедра патологической анатомии, кафедра фармакологии* ВолГМУ

КЛЕТОЧНАЯ ГИБЕЛЬ β -ЭНДОКРИНОЦИТОВ ПАНКРЕАТИЧЕСКИХ ОСТРОВКОВ, ОБУСЛОВЛЕННАЯ АЛЛОКСАНОВОЙ ЦИТОТОКСИЧНОСТЬЮ

УДК 616.37:616.018.1-018

Авторами дано морфологическое обоснование цитотоксического действия аллоксана на β -клетки поджелудочной железы, уточнен механизм их гибели.

Ключевые слова: сахарный диабет, аллоксан, апоптоз, β -клетки.

Селективную деструкцию β -клеток панкреатических островков вызывают некоторые химические вещества хлорозотоцин, аллоксан, стрептозотоцин, ципрогептадин. Наиболее широкое применение для моделирования сахарного диабета у животных получили аллоксан и стрептозотоцин [6]. Данные вещества повреждают β -клетки человека и лабораторных животных (мыши, крысы, собаки) [7]. Моделирование различных по тяжести состояний нарушения углеводного обмена (явный сахарный диабет различной формы: инсулинозависимый и инсулинонезависимый, нарушенная толерантность к углеводам или скрытый диабет) зависит от применяемой в эксперименте дозы цитотоксинов.

Повреждающее действие β -цитотоксинов осуществляется посредством нескольких механизмов: формирование разрывов ДНК с последующей активацией поли-АДФ-рибозо-синтетазы; угнетение активного транспорта кальция и кальмодулин-активированной протеинкиназы; генерация свободных радикалов кислорода, нарушающих эндогенные процессы защитной функции клетки.

Однако, несмотря на то, что аллоксан имеет многолетнюю историю применения, некоторые механизмы клеточного повреждения, обусловленного его введением, изучены не в полном объеме.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Уточнение механизмов клеточной гибели β -эндокриноцитов панкреатических островков при введении аллоксана.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводили на 20 белых крысах-самцах массой 300—340 г., разделенных на

две группы. Животным опытной группы осуществляли однократную внутрибрюшинную инъекцию аллоксана в дозе 120 мг/кг. Контролем являлись интактные крысы, содержащиеся в стандартных условиях вивария. Протокол экспериментальной части исследования согласован с Региональным этическим комитетом (решение № 43, 2006). Спустя 7 дней животных выводили из эксперимента, изготавливали микропрепараты поджелудочной железы по общепринятым гистологическим методикам с последующей окраской гематоксилином и эозином. Иммуногистохимическое исследование выполняли на базе лаборатории морфологии и иммуногистохимии отдела общей и экспериментальной патологии Волгоградского научного центра РАН. Были использованы моноклональные антитела к каспазе 3 (клон JHM62), протеину MDM2 (клон 1B10), NO-синтазе-3 (клон RN5), TNF-апоптоз индуцирующему лиганду (TRAIL, клон 27B12) (Novocastra, Великобритания) и белку Bcl-2 (клон sc-7382, Santa Cruz, США) и поликлональных антител к белкам p53 (DakoCytomation, Дания) и Вах (BD Pharmingen, США). Визуализацию проводили с помощью непрямого иммунопероксидазного метода.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В группе интактных животных поджелудочная железа имела классическое гистологическое строение: дольки альвеолярно-трубчатого строения, разделенные тонкими прослойками соединительной ткани. Вблизи выводных протоков располагались островки Лангерганса. При иммуногистохимическом исследовании эндокриноциты панкреатических островков были негативны к окрашиванию на белки

NO-синтаза-3, TRAIL, p53 и Вах. Единичные слабо Bcl-2-позитивные эндокриноциты располагались в центральных отделах островков. Большинство клеток островков Лангерганса имели позитивную ядерную окраску к протеину MDM2.

В группе животных с аллоксан-индуцированным сахарным диабетом отмечался отек междольковой соединительной ткани и полнокровие кровеносных капилляров поджелудочной железы. Определялся умеренный коллапс панкреатических островков. В эндокриноцитах, расположенных в центральных отделах островков, отмечались признаки деструкции. Наблюдалось негативное иммуногистохимическое окрашивание β -клеток к белкам p53, TRAIL и NO-синтазе-3. Слабо позитивно окрашивалась цитоплазма к протеину Bcl-2. Экспрессия белков каспазы 3 и Вах была умеренной в большинстве β -эндокриноцитов. В незначительной части клеток (расположенных преимущественно в периферических отделах островков Лангерганса) отмечалось умеренное ядерное окрашивание к белку MDM2.

Известно, что повреждение ДНК β -клеток панкреатических островков обусловлено избирательной цитотоксичностью аллоксана за счет образования активных форм кислорода и перекиси водорода, что приводит к окислению SH-групп белков. Открытым остается вопрос об участии оксида азота (NO) в цитотоксическом эффекте аллоксана, так как при низких концентрациях NO в β -клетках ингибируются индуцибельные формы NO-синтазы и уменьшается повреждение ДНК [3].

Важным аспектом аллоксановой цитотоксичности является нарушение интрацеллюлярного гомеостаза кальция. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* подтверждено увеличение концентрации цитоплазматического кальция в клетках панкреатических островков при аллоксановом диабете. Избыточное поступление кальция из внеклеточной жидкости и его мобилизация из внутриклеточных депо обусловлена деполяризацией клеточных мембран и мембран митохондрий β -клеток [2, 7]. Грубое повреждение внутриклеточных структур свободными радикалами, окисление SH-групп белков и нарушение внутриклеточного гомеостаза кальция сопровождается развитием некроза.

Однако существует и другой механизм гибели β -клеток — апоптоз. Одним из пусковых факторов апоптоза в результате действия сильных окислителей является повреждение ДНК или внутриклеточных мембран митохондрий. Ключевое положение в реализации механизмов клеточной гибели занимает белок p53 и семейство цитоплазматических протеаз — каспаз. Белок p53 является ключевым звеном в развитии апоптоза, однако существуют механизмы запрограммированной кле-

точной гибели без участия данного белка (механизм действия фактора некроза опухоли). Белок MDM2 является антиапоптогеном и предохраняет клетку от запрограммированной гибели путем ингибирования синтеза протеина p53 и ускорения его распад в цитозоле [1].

Семейство каспаз образует разветвленный каскад, взаимно активирующий друг друга [8]. Активация каспазного каскада возможна с помощью сигнала, полученного от цитолеммы (каспаза 8), или в результате митохондриальных факторов (каспаза 9). Каспазы 8 и 9 активируют эффекторную каспазу 3, после чего процесс клеточной смерти оказывается необратимым [4].

Однако активация апоптоза возможна и без участия каспазного каскада. Гиперэкспрессия белка-промотора апоптоза Вах приводит к дестабилизации мембран митохондрий и индуцирует апоптоз. Проницаемость мембран митохондрий для кальция регулируется белками семейства Bcl-2/Вах. Протеин Bcl-2 оказывает ингибирующее действие на апоптоз за счёт снижения проницаемости мембран, а Вах наоборот активирует апоптоз, так как увеличивает проницаемость. Таким образом, митохондриальная ветвь апоптоза может активироваться протеином Вах с дальнейшей активацией только эффекторной каспазы-3 [5].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, реализация цитотоксического эффекта аллоксана происходит за счёт развития двух процессов: некроза и апоптоза. Действие свободных радикалов и окисление SH-групп белков приводит к грубому деструктивному процессу — некрозу, а апоптоз активируется за счёт нарушения гомеостаза кальция и дестабилизации мембран митохондрий с последующей активацией каспазного каскада без участия белка p53.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мушамбаров Н. Н., Кузнецов С. Л. Молекулярная биология. — М.: «МИА», 2003. — 544 с.
2. Elsner M., Tiedge M., Guldbakke B., et al. // *Diabetologia*. — 2002. — Vol. 45. — № 11. — P. 1542—1549.
3. Kroncke K. D., Fehsel K., Sommer A., et al. // *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*. — 1995. Vol. 376. — № 3 — P. 179—185.
4. Nakayama T., Hattori M., Uchida K., et al. // *Biochem J*. — 2004. Vol. 377. — № 2. — P. 299—307.
5. Selvakumaran M., Lin H. K., Miyashita T., et al. // *Oncogene*. — 1994. — Vol. 9. — № 6. — P. 1791—1798.
6. Srinivasan K., Ramarao P. // *Indian J. Med. Res.* — 2007. — Vol. 125. — № 3. — P. 451—472.
7. Szkuvelski T. // *Physiol. Res.* — 2001. — Vol. 50. — № 6. — P. 536—546.
8. Wilson B., Mochon E., Boxer L. // *Mol. Cell. Biol.* — 1996. — Vol. 16. — № 10. — P. 5546—5556.