

---

# МОРФОЛОГИЯ

---

Г. Л. Снигур, А. А. Спасов, М. П. Воронкова

Волгоградский медицинский научный центр, лаборатория морфологии и иммуногистохимии,  
Волгоградский государственный медицинский университет, кафедра фармакологии

## АПОПТОЗ $\beta$ -ИНСУЛОЦИТОВ ПАНКРЕАТИЧЕСКИХ ОСТРОВКОВ И ПУТИ ЕГО ФАРМАКОКОРРЕКЦИИ

УДК 616.379-008.64:616-076:006.05

В эксперименте на крысах уточнены механизмы апоптоза  $\beta$ -клеток панкреатических островков. Установлено, что пероральное введение гимнемовых кислот существенно снижает степень повреждения  $\beta$ -эндокриноцитов за счет угнетения апоптоза. Выявлены особенности патоморфоза иммунозависимого сахарного диабета и инкретиноподобные свойства гимнемовых кислот.

*Ключевые слова:* сахарный диабет,  $\beta$ -инсулоциты, апоптоз, гимнемовые кислоты.

---

G. L. Snigur, A. A. Spasov, M. P. Voronkova

## APOPTOSIS IN ISLET CELLS, PANCREATIC ISLETS AND HOW ITS PHARMACOLOGICAL CORRECTION

In experiment on rats mechanisms apoptosis  $\beta$ -cells of pancreatic islets are specified. It is established that peros introduction Gymnema sylvestre acids essentially reduces a damage rate  $\beta$ -cells, at the expense of oppression apoptosis. Features pathomorfosis experimental diabetes mellitus and incretinlike properties Gymnema sylvestre acids.

*Key words:* diabetes mellitus, pancreatic  $\beta$ -cells, apoptosis, Gymnema sylvestre.

---

В настоящее время одной из ведущих медико-социальных проблем, имеющей ранг социально-значимого заболевания, является сахарный диабет (СД) [1, 2]. В результате органоспецифического ауто-иммунного поражения и прогрессирующей гибели  $\beta$ -клеток поджелудочной железы развивается инсулиновая недостаточность.

### ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Определить механизмы развития апоптоза  $\beta$ -эндокриноцитов и его ингибирования.

### МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводили на белых крысах-самцах, массой 300—340 г, разделенных на три группы: 1) интактные ( $n = 10$ ); 2) иммунозависимый СД ( $n = 10$ ); 3) иммунозависимый СД на фоне введения гимнемовых кислот ( $n = 10$ ). Животным второй группы производилось пероральное введение гимнемовых кислот (патент № 2289419 от 20.12.2004) в дозе 280 мг/кг, 2 раза/сут. Контрольная группа (интакт-

ные крысы) и 2-я группа (иммунозависимый СД) получали питьевую воду в аналогичном объеме. Через неделю во 2-й и 3-й группах, однократно осуществляли под кожу инъекцию 0,2 мл полного адъюванта Фрейнда и ежедневные внутривенные инъекции стрептозотоцина в дозе 20 мг/кг в течение 5 дней. При работе с животными руководствовались правилами лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 351000.3-96 и 51000.4-96) и решением регионального этического комитета (№ 43-2006). Спустя три недели, соблюдая принципы гуманного отношения, животных выводили из эксперимента и осуществляли гистологическое исследование. Микропрепараты поджелудочной железы изготавливали по общепринятым гистологическим методикам. Иммуногистохимическое исследование проводили в соответствии с протоколами фирм производителей антител с использованием антител к протеинам каспаза 3, TRAIL, MDM2, Bcl2 и белкам p53 и Вах. Характер иммуногистохимической реакции оцени-

вали визуально в баллах с учетом интенсивности окраски и количества окрашенных клеток по шкале Allred D. C., et al. (1998). Проводили морфометрический анализ с помощью программы анализа изображений «ВидеоТестМорфо-4». Определяли индекс апоптоза (число  $\beta$ -клеток панкреатических островков с признаками апоптоза на 100 клеток). Статистическую обработку данных проводили в программе «MS Excel» с расчетом базовых статистических показателей ( $M$ ,  $m$ ) и использованием парного  $t$ -критерия Стьюдента при достоверности  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В поджелудочной железе интактных животных экспрессия белка Вах была негативной во всех островковых клетках. Определялось слабое позитивное цитоплазматическое окрашивание инсулоцитов центральных отделов островка к протеину Bcl-2. Ядра единичных  $\beta$ -эндокриноцитов слабо экспрессировали белок p53. Большинство  $\beta$ -инсулоцитов имели позитивную ядерную экспрессию MDM2. В отдельных  $\beta$ -эндокриноцитах цитоплазматическая экспрессия каспазы 3 и TRAIL носила слабо выраженный характер. Апоптотический индекс был низким (табл.). При развитии иммунозависимого СД отмечалась слабая экспрессия протеинов p53, Вах, MDM2 и Bcl-2 в единичных  $\beta$ -инсулоцитах. В большинстве  $\beta$ -эндокриноцитов усиливалась экспрессия TRAIL и каспазы 3. Происходило достоверное увеличение  $\beta$ -эндокриноцитов, находящихся в состоянии апоптоза по сравнению с контрольной группой животных (табл.). В группе животных со стрептозотоцин-индуцированным СД, получавших экстракт гимнемовых кислот, определялась слабо выраженная экспрессия белков p53, Bcl-2, а Вах — негативная. В большинстве  $\beta$ -клеток островков Лангерганса нарастала экспрессия протеина MDM2. В единичных  $\beta$ -инсулоцитах панкреатических островков отмечалась слабая экспрессия каспазы 3 и TRAIL. Количество  $\beta$ -клеток в состоянии апоптоза по сравнению с животными с иммунозависимым СД достоверно уменьшалось (табл.).

### Индексы апоптоза $\beta$ -инсулоцитов

Группы	Апоптотический индекс
Интактный контроль	4,1 ± 0,2
Иммунозависимый СД	35,2 ± 2,9*
Иммунозависимый СД + «Диабета»	13,3 ± 1,1**

\* Достоверно по отношению к интактному контролю;

\*\* достоверно по отношению к группе с иммунозависимым СД.

Значительная роль апоптоза в патогенезе сахарного диабета подтверждается большим числом экспериментальных фактов [3]. Известно, что

апоптоз является активной, запрограммированной формой клеточной гибели, которая реализуется в ответ на воздействие большого числа повреждающих агентов. В качестве индукторов апоптоза могут выступать как вне-, так и внутриклеточные факторы. Поэтому выделяют «внешний» и «внутренний» сигнальные пути развития апоптоза. «Внешний» является рецептор-опосредованным путем и реализуется за счет активации мембранных протеинов, в том числе и рецептора TRAIL. Увеличение экспрессии протеина TRAIL у животных с иммунозависимым сахарным диабетом свидетельствует о возможности активации апоптоза по «внешнему» пути, с последующей активацией инициаторных и эффекторных каспаз. Скорость развития апоптоза при активации «внешнего» пути выше, поэтому он играет существенную роль в деструкции панкреатических  $\beta$ -инсулоцитов. «Внутренний» — является митохондриальным и обусловлен повреждением ДНК в результате токсического воздействия на клетку [4].

Центральное место в развитии апоптоза занимает семейство цистеиновых протеаз, так называемый каспаз, которые образуют разветвленный каскад, взаимно активируя друг друга. В результате активации инициаторных каспаз 8 и 9 происходит активация эффекторной каспазы 3, которая осуществляет протеолиз ядерных белков [4, 6].

Токсическое действие стрептозотоцина на  $\beta$ -клетки панкреатических островков реализуется за счет алкилирования ДНК и образования токсических соединений — супероксид аниона, пероксинитрита и оксида азота. Повреждения ДНК и внутриклеточных структур сопровождаются развитием апоптоза  $\beta$ -эндокриноцитов островков Лангерганса. Пусковым моментом запрограммированной клеточной гибели в данном случае является «внутренний» путь. В результате повреждения мембран митохондрий и активации протеина Вах возникает высвобождение в цитозоль апоптотических факторов, в том числе цитохрома с и белка AIF [7, 8]. Цитохром с активирует инициаторную каспазу 9, которая стимулирует эффекторную каспазу 3. Белок Bcl2, напротив, способствует стабилизации мембран митохондрий и блокирует выход из них апоптогенных факторов. Увеличение экспрессии Вах у животных с иммунозависимым сахарным диабетом свидетельствует об активации «внутреннего» пути апоптоза. В группе животных получавших препарат «Диабета» отмечается экспрессия протеина Bcl2, являющегося антиапоптогенным фактором. Таким образом, митохондриальный путь играет важную роль в развитии прогрессирующей убыли  $\beta$ -инсулоцитов панкреатических островков при экспериментальном сахарном диабете, а гимнемовые кислоты предотвращают развитие апоптоза [3]. Возможность регуляции апоптоза  $\beta$ -инсулоцитов путем фармакологической коррекции и

влияния на его потенциальные пусковые факторы в настоящее время является перспективным направлением фармакологии [2]. Ингибция апоптоза  $\beta$ -клеток, обусловленная введением гимнемовых кислот, может быть объяснена инкретиномиметическим эффектом, то есть стимуляцией GLP-1, который регулирует баланс клеточной популяции островков Лангерганса, угнетая апоптоз [5, 8].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Апоптоз  $\beta$ -клеток панкреатических островков реализуется не только за счет «внутреннего» пути, но и активации «внешнего» пути — ФНО-зависимого апоптоза (TRAIL-опосредованный механизм). Пероральное введение гимнемовых кислот существенно снижает степень повреждения  $\beta$ -эндокриноцитов, за счет угнетения апоптоза. Выявленные особенности патоморфоза иммунозависимого СД

вероятно обусловлены инкретиноподобным действием гимнемовых кислот, входящих в состав препарата «Диабета».

## ЛИТЕРАТУРА

1. Балаболкин М. И. Диабетология. — М.: Медицина, 2000. — С. 672.
2. Воронкова М. П. Противодиабетическая активность гимнемовых кислот: Дис. ... д. б. н. — Волгоград, 2009. — С. 338.
3. Писарев В. Б., Снугур Г. Л., Спасов А. А. и др. // Бюлл. эксп. биол. и мед. — 2009. — Т. 148, № 12. — С. 700—702.
4. Мушамбаров Н. Н., Кузнецов С. Л. // Молекулярная биология. — М.: «МИА», 2003. — С. 544.
5. Drucker D. J. // Endoc. — 2003. — Vol. 144, № 1. — P. 5145—5148.
6. Nakayama T., Hattori M., Uchida K., et al. // Biochem J. — 2004. — Vol. 377, № 2. — P. 299—307.
7. Szkudelski T. // Physiol. Res. — 2001. — Vol. 50, № 6. — P. 536—546.
8. Trucco M. // J. Clin. Investigation. — 2005. — Vol. 115, № 1. — P. 5—12.

**Е. Н. Букина, Р. П. Самусев**

Волгоградская государственная академия физической культуры

## ХАРАКТЕРИСТИКА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ СТОП У СПОРТСМЕНОВ РАЗЛИЧНЫХ СПОРТИВНЫХ СПЕЦИАЛИЗАЦИЙ

УДК 617.586 : 796.071.2.

Представленная работа раскрывает новые пути углубленной диагностики состояния здоровья стоп современными методами компьютерной плантографии. Итоги анализа эффективности волгоградской технологии плантографии с высокой степенью достоверности свидетельствуют о несомненных ее преимуществах перед другими известными способами оценки состояния стоп у спортсменов.

*Ключевые слова:* метод компьютерной плантографии, структурно-функциональное состояние стоп.

**E. N. Bukina, R. P. Samusev**

## CHARACTERISTICS OF STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CONDITION OF FEET IN ATHLETES OF VARIOUS SPECIALIZATIONS

The presented work proposes a new way of comprehensive diagnostics of the state of feet by modern methods of computerized plantography. An analysis of the efficiency of the Volgograd plantography technology with a high degree of reliability testify to its doubtless advantages over other known ways of assessing the condition of feet in athletes.

*Key words:* method of computerized plantography, structural and functional condition of feet.

Проблема диагностики морфологического и функционального состояния стопы является актуальной в решении многих вопросов сохранения и укрепления здоровья студентов спортивных вузов. Известно, что изучение структуры и

функции стопы человека, как в норме, так и при патологии, до настоящего времени являлось трудной задачей.

Среди различных деформаций нижних конечностей наиболее часто встречается плоскостопие.