

**Т. Ю. Квитницкая-Рыжова, С. П. Луговской, П. П. Клименко,
Г. В. Хаблак, С. П. Малышева, Е. К. Топорова***

*Государственное учреждение "Институт геронтологии
им. Д. Ф. Чеботарева НАМН Украины", 04114 Киев
*Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,
03143 Киев*

ВЛИЯНИЕ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ НА МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

На модели стрептозотоцинининдуцированного сахарного диабета (СД) у молодых (3–5 мес) и старых (18–20 мес) мышей с помощью светооптических, гистохимических и морфометрических исследований показан комплекс альтеративных изменений панкреатических островков (ПО), свидетельствующий о развитии дистрофических процессов и снижении функциональной (синтетической и секреторной) активности β -клеток, а также об усилении интенсивности апоптоза, что было особенно выражено у старых животных. При введении молодым животным с СД плазмидного комплекса *PEI-pDNA*, несущего ген пре-проинсулина, отмечены определенная нормализация структуры поджелудочной железы (ПЖ) и снижение интенсивности апоптоза (уменьшение количества *TUNEL*-положительных клеток). Происходит увеличение общего количества ПО, а также их удельного объема в общем объеме ткани ПЖ, что сочетается с увеличением удельного объема функционально активных β -клеток (с альдегид-фуксин положительной цитоплазмой) в общем объеме островков, по сравнению с этими показателями у животных с СД, которым не была введена плаزمид. Хотя применение генной терапии не приводило к возвращению этих показателей до уровня контрольных групп, тем не менее отмечена четкая тенденция к их нормализации, что сочетается с нормализацией концентрации глюкозы в крови экспериментальных животных, которым вводился плазмидный комплекс.

Ключевые слова: поджелудочная железа, β -клетки, структура, апоптоз, *TUNEL*-метод, сахарный диабет, генная терапия.

Проблема сахарного диабета (СД) считается одной из основных проблем здравоохранения XXI века и пятой по значимости причиной смертности во всем мире [2, 6]. Распространенность СД неуклонно увеличивается, особенно с возрастом, что позволяет считать это заболевание возрастзависимым. В США примерно 20 % населения в возрасте свыше 60 лет больны СД [2]. Следует отметить выраженную тенденцию к увеличению числа заболевших СД: к 2030 г. ожидается рост численности больных с этой патологией во всем мире до 370 млн человек [11]. Учитывая прогнозируемое постарение населения, очевидно, что доля больных пожилого возраста будет также увеличиваться.

В патогенезе СД (I типа) ведущую роль играет повреждение панкреатических островков (ПО) Лангерганса, в частности в результате аутоиммунного процесса, что приводит к недостаточности синтеза инсулина. При моделировании СД у экспериментальных животных широко применяется введение стрептозотоцина (СТЦ), оказывающего токсическое действие на β -клетки поджелудочной железы (ПЖ). Модель СТЦ-зависимого экспериментального СД является наиболее употребляемой как для изучения механизмов развития заболевания (в том числе в различные возрастные периоды), так и для поиска новых подходов для его коррекции.

При изучении патофизиологии СД особый интерес вызывает проблема апоптоза, поскольку появляется все больше доказательств апоптотического механизма гибели клеток различных органов при этой патологии [1, 8]. В связи с этим принципиально важным является изучение характера клеточной гибели инсулоцитов, в первую очередь образующих центральную часть островков, синтезирующих инсулин, β -клеток, которые составляют 60–70 % общего их числа. Считается, что у больных с диагностированным СД 60–90 % β -клеток либо разрушены, либо пребывают в состоянии дисфункции [7]. Оценка интенсивности апоптоза в ПО может служить одним из критериев эффективности различных подходов лечения СД.

В то же время, многие исследования указывают на существенные различия уровня апоптоза β -клеток у больных СД — от его отсутствия до достаточно высоких значений. Так, исследование группы авторов из одной и той же лаборатории показало незначительное повышение уровня апоптоза (приблизительно 0,2 *TUNEL*-положительных клеток на один ПО) по сравнению с их отсутствием у здоровых пациентов [5], а в другом исследовании — увеличение количества таких клеток на 6 %, что вдвое превышает их число в контрольной группе [9]. Сочетание высоких значений показателей концентрации глюкозы в крови, ацидоза и других неблагоприятных факторов с низким уровнем апоптоза β -клеток у таких пациентов указывает на то, что эти клетки могут быть более устойчивыми и выносливыми, чем принято считать [7].

Как и другие типы клеток, инсулоциты обладают способностью восстанавливаться после повреждения и обновляться. Допускается их способность к пролиферации, а также и такой механизм, как дифференцировка клеток-предшественников [4, 7]. Кроме того, сильный приток лимфоцитарных клеток при воспалительной реакции может стиму-

лизовать репликацию ДНК β -клеток [10]. Тот факт, что β -клетки могут получать определенные преимущества от наличия воспалительного процесса, а также их относительная устойчивость при неблагоприятных воздействиях, вселяет некоторый оптимизм. Все это указывает на существование мощных путей их выживания и на целесообразность поиска новых подходов, дающих этим клеткам мягкий толчок для движения в правильном направлении.

В огромном массиве работ, посвященных поиску путей коррекции СД, особое место занимают исследования в области генной терапии. Коллективом сотрудников Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины под руководством академика В. А. Кордюма был сконструирован эукариотический вектор экспрессии гена препроинсулина человека для последующей доставки в неэндокринные клетки млекопитающих с целью разработки экспериментальной генной терапии диабета I типа [3]. Последовательность гена препроинсулина человека высокоомологична последовательности гена препроинсулина экспериментальных животных, а также обладает высокой внутренней гомологией в связи с присутствием множественных кратких повторов [3].

Целью настоящей работы было изучение возрастных морфологических, гистохимических и морфометрических особенностей, а также проявлений апоптоза в ПЖ при моделировании СТЦ-зависимого СД и его коррекции с помощью генной терапии — экспериментальным препаратом *PEI-pDNA* комплексом, несущим ген препроинсулина.

Материал и методы. Исследования проводили на мышах линии *C57BL/6j* двух возрастных групп: 3–5-месячные и 18–20-месячные.

Для моделирования СД 1 раз в день в течение 5 суток делали внутрибрюшинную инъекцию СТЦ ("*Sigma*", США) из расчета 40 мг/кг на цитратном буфере (0,1 моль/л, рН 5). Развитие гипергликемии контролировали с помощью глюкометра (*Accu-Chek Active*, Германия). Забор крови проводили натошак с помощью микрокапилляров из ретроорбитального венозного синуса. Животных декапитировали через 5 недель после развития стойкой гипергликемии. В качестве контроля использовали интактных животных того же возраста, которым внутрибрюшинно вводили цитратный буфер.

Часть животных с СТЦ-индуцированным СД (3–5-месячные) подвергалась генной терапии плазмидным комплексом *PEI-pDNA*, содержащим ген препроинсулина. Через 4 недели после развития устойчивого диабета в их печень вводился раствор, содержащий плазмидный вектор для доставки гена препроинсулина человека, который был получен в отделе регуляторных механизмов клетки (руководитель — академик НАМН Украины В. А. Кордюм) Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины. Плазида со встроенным геном препроинсулина человека, преципитированная полиэтиленимином (ПЭИ, 25кД), готовилась *ex tempore* за 10 мин до введения. Объем преципитированной ДНК составлял 90 мкл, содержание плазмидной ДНК в препарате — 10 мкг (на одно животное), весовое соотношение ДНК/ПЭИ

составляло 1:2. Перед введением препарата ДНК животных выдерживали на голоде в течение 4 часов. После введения их в глубокий наркоз (смесь 5 % кетамина с ксилозином — 1:10 по 100–150 мкл в зависимости от массы тела животного) делали небольшой разрез размером 1 см чуть ниже левого подреберья — сначала кожи, а затем брюшины. В поле зрения была отчетливо видна нижняя часть печени, в частности большая ее доля. Именно сюда вводили препарат ДНК инсулиновым шприцом с иглой G29. После этого накладывали шелковыми стерильными нитями шов — сначала на брюшине, а затем на коже. Оперированные животные через 10–15 мин выходили из наркоза и начинали двигаться в клетке. Группа сравнения (мыши с СТЦ-индуцированным диабетом) и контрольная группа мышей получали физиологический раствор в том же объеме.

На 30-е сут после введения плазмиды животных декапитировали. Использовано 12 контрольных мышей (7 молодых и 5 старых), 15 со СТЦ-индуцированным диабетом (10 молодых и 5 старых) и 6 молодых со СТЦ-индуцированным диабетом, получавших плазмиду с геном препроинсулина человека.

ПЖ изучали с помощью стандартных гистологических методов — фиксировали в фиксаторе Буэна, обезжовивали по стандартной методике в растворах этанола возрастающей концентрации и заливали в парафине типа 6 (*Richard-Allan Scientific*, США). Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином, а также альдегид-фуксином по Гомори (для выявления секреторных гранул в β -клетках ПО).

Полученные гистологические препараты изучали и фотографировали при увеличении $\times 40$, $\times 100$, $\times 200$ и $\times 400$ с использованием системы анализа изображений на основе микроскопа *Olympus BX51* с программным обеспечением *Olympus DP-Soft 3.2*.

Во всех группах экспериментальных животных вычисляли следующие морфометрические показатели: количество ПО на 1 мм² площади гистологического среза ПЖ, удельный объем эндокринной ткани в общем объеме ПЖ, удельный объем β -клеток в общем объеме ПО, количество дистрофически измененных инсулоцитов в ПО, количество лимфоцитов в ПО.

Апоптоз выявляли с помощью иммуногистохимического варианта *TUNEL*-метода с использованием коммерческих наборов (*ApopTag® Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit*, *Chemicon*, США). Кусочки ткани ПЖ фиксировали в 4 % растворе очищенного параформальдегида на фосфатном буфере не более 24 часов. После стандартной гистологической обработки их заливали в *Paraplast X-TRA* и изготавливали срезы толщиной 5 мкм. Депарафинированные срезы подвергали воздействию протеиназы *K* для разрыва связей, образовавшихся при фиксации альдегидами. Для подавления активности эндогенной пероксидазы срезы обрабатывали 3 % раствором перекиси водорода. Главным этапом *TUNEL*-метода является катализируемая (1 ч при 37 °C) ферментом терминальной диоксинуклеотидилтрансферазой (*TdT*) реакция присоединения нуклеотидов, соединенных с дигоксигенином, к образованным в процессе апоптоза 3-ОН-кон-

цам олигонуклеосомальных фрагментов молекулы ДНК. Далее срезы инкубировали (30 мин при комнатной температуре) в анти-дигоксигениновом конъюгате (антитела, связанные с пероксидазой). При добавлении диаминобензидина (ДАБ) и перекиси водорода пероксидаза катализирует окисление ДАБ с образованием нерастворимого темно-коричневого продукта реакции в местах фрагментации ДНК. Докраску тканей производили с помощью метиленового зеленого.

Негативный контроль реакции проводили путем аналогичной обработки срезов с заменой фермента *TdT* эквивалентным количеством буфера. В качестве позитивного контроля использовали предоставленные в наборе для определения апоптоза срезы мышины молочной железы, взятой через 3–5 сут после прекращения вскармливания потомства. Для количественной оценки выраженности апоптоза вычисляли количество *TUNEL*-положительных клеток в ПО.

Статистический анализ проводили методами непараметрической статистики с использованием программного продукта *STATISTICA 6.0 Stat Soft inc.* Для проверки статистических гипотез использовали критерий *U* Вилкоксона — Манна — Уитни.

Результаты и их обсуждение. Эффект моделирования СД с помощью введения СТЦ, а также его коррекции с помощью генной терапии выявлялся путем определения концентрации глюкозы в крови экспериментальных животных. При экспериментальном СД у молодых животных она увеличивалась практически вдвое — $(4,5 \pm 0,48)$ ммоль/л в контроле и $(18,64 \pm 2,85)$ ммоль/л при СД, а при введении *PEI-pDNA* (комплекса, несущего ген препроинсулина) снижалась, приближаясь к контрольному уровню — $(6,07 \pm 1,6)$ ммоль/л.

В условиях моделирования СД при гистологическом исследовании в обеих возрастных группах отмечены существенные структурные изменения всех компонентов ПЖ — отёк соединительнотканной стромы органа, расширение просветов и полнокровие кровеносных капилляров, расширение просветов протоков, а также дистрофические изменения экзо- и эндокринной части железы. ПО, отграниченные от эндокринной части ПЖ тонкими прослойками соединительной ткани, заметно уменьшались в размерах по сравнению с контролем, приобретая зачастую вытянутую форму (рис. 1 а, б). В инсулоцитах, расположенных вокруг расширенных гемокапилляров, отмечали просветление цитоплазмы и пикноз ядер.

При окраске гистологических срезов ПЖ альдегид-фуксином по Гомори (*A-F*) обнаружено, что воздействие СТЦ приводит к резкому снижению количества β -инсулоцитов с *A-F*-позитивными цитоплазматическими гранулами в ПО. Вместе с этим в β -инсулоцитах заметно снижается и общее количество содержащихся в цитоплазме *A-F*-позитивных секреторных гранул (рис. 1 в, г), что является свидетельством нарушения процессов синтеза и секреции инсулина в этих клетках. Применение *TUNEL*-метода определения апоптоза позволило выявить увеличение количества *TUNEL*-положительных инсулоцитов в ПО (0,08 в контроле

и 3,25 при СД), что свидетельствует об усилении процесса клеточной гибели при моделировании этой патологии.

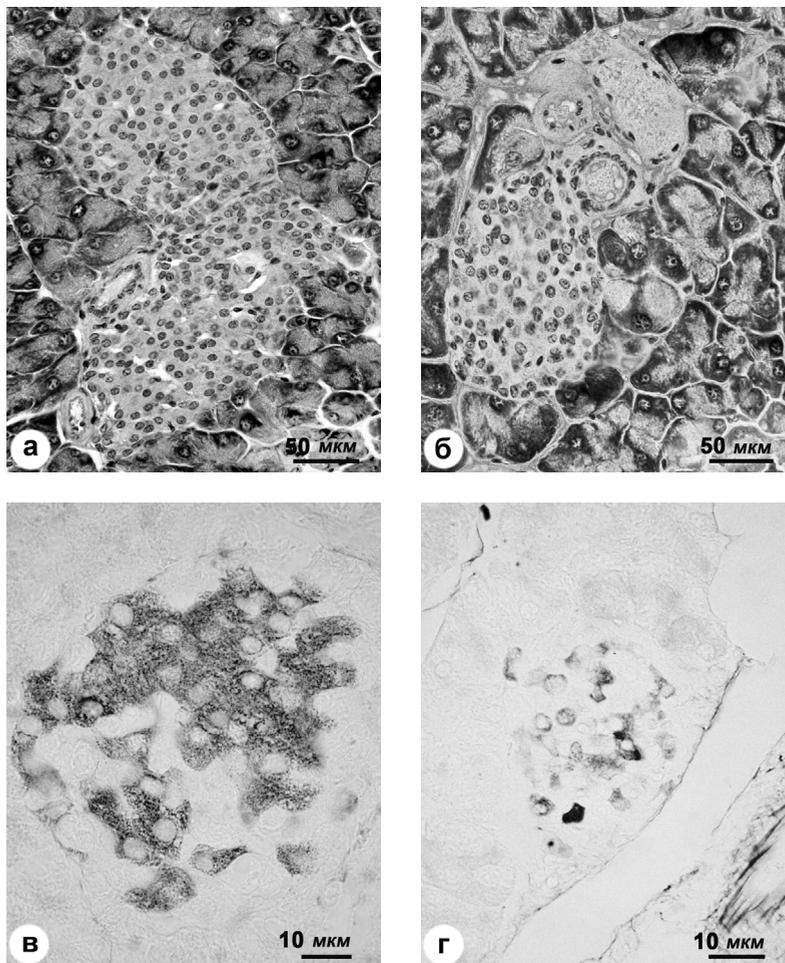


Рис. 1. Гистологические изменения панкреатических островков молодых мышей контрольной группы (а, в) и при СТЦ-индуцированном СД (б, г). Гематоксилин и эозин (а, б), альдегид-фуксин Гомори (в, г).

При экспериментальном СД уменьшение размеров островков в ПЖ молодых мышей сочеталось со снижением их общего количества на единицу площади. В контрольной группе количество ПО определялось в пределах от 0,40 до 0,89 в 1 мм² площади гистологического среза ПЖ, а при СТЦ-индуцированном СД, соответственно, от 0,14 до 0,61. При этом значения Me (Q_{25} ; Q_{75}) данного показателя в контроле 0,70 (0,67; 0,71) и при СТЦ-индуцированном СД 0,29 (0,23; 0,36) обнаруживало статистически значимые ($P_u < 0,05$) отличия в группах (рис. 2 А).

Удельный объем эндокринной ткани в общем объеме ПЖ молодых мышей контрольной группы был в пределах минимальных и максимальных значений от 0,49 усл. ед. до 1,57 усл. ед., а при СТЦ-индуцированном СД — от 0,12 усл. ед. до 0,50 усл. При этом значения Me (Q_{25} ; Q_{75}) данного показателя при СТЦ-индуцированном СД — 0,23 (0,16; 0,32) статистически значимо ($P_u < 0,05$) отличались от контроля — 0,95 (0,50; 1,25) (см. рис. 2 Б).

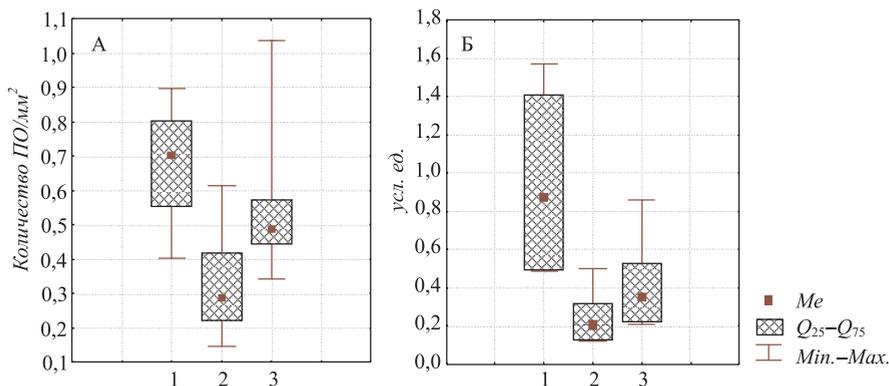


Рис. 2. Изменения общего количества ПО в 1 мм^2 площади среза ПЖ (А) и удельного объема ПО в общем объеме ПЖ (Б) у молодых мышей контрольной группы (1), с СТЦ-индуцированным СД (2) и при его коррекции *PEI-pDNA* комплексом (3).

Для оценки функциональной активности β -клеток на окрашенных $A-F$ препаратах ПЖ у молодых мышей планиметрическим методом определяли удельный объем активно функционирующих β -клеток в общем объеме ПО. В цитоплазме этих клеток, как известно, содержится большое количество секреторных гранул, которые окрашиваются $A-F$ в интенсивно-фиолетовый цвет. Результаты проведенных исследований показали, что у контрольных мышей в ПО удельный объем β -клеток был в пределах от 15,42 усл. ед. до 72,00 усл. ед., определяя значения Me (Q_{25} ; Q_{75}) на уровне 46,12 (27,80; 61,50). При СТЦ-индуцированном СД этот показатель был в пределах от 0,0 усл. ед. до 23,54 усл. ед., определяя значения Me (Q_{25} ; Q_{75}) на уровне 4,90 (0,40; 9,04), что статистически значимо отличало эту группу мышей от контроля ($P_u < 0,05$; рис. 3).

При моделировании СД у старых животных отмечены аналогичные изменения ПЖ, однако они оказались значительно более глубокими и демонстративными. Количество островков, их величина, а также количество инсулоцитов в них уменьшалось по сравнению с контрольной группой более выражено, чем у молодых. Дистрофические и деструктивные изменения в клетках инсулярного аппарата оказались более выраженными. Альтеративные изменения отдельных инсулоцитов, их цитолиз и кариолиз, наблюдались гораздо чаще, чем у молодых животных с СД. Заметно увеличивалась лимфоцитарная инфильтрация островков,

отмечался очаговый склероз, а также кистообразование на месте погибших островков. В перинсулярной области наблюдался отёк и оксифилия клеток экзокринной части железы.

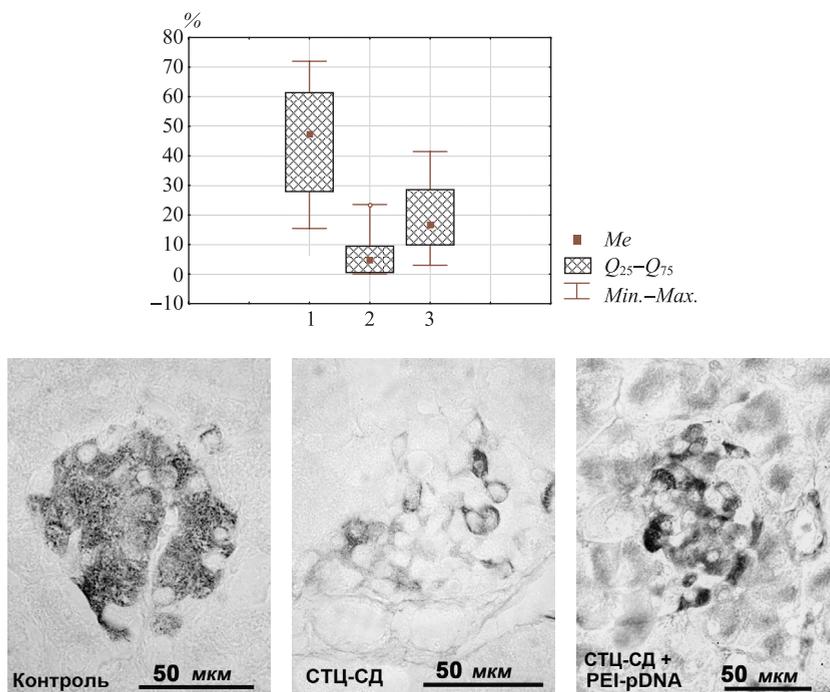


Рис. 3. Удельный объем инсулоцитов с *A-F* позитивной цитоплазмой в общем объеме островков ПЖ молодых мышей контрольной группы (1), при СТЦ-индуцированном СД (2) и его коррекции с помощью *PEI-pDNA* комплекса (3).

У старых животных при СД были особенно интенсивно выражены процессы апоптоза как в инсулоцитах, эндотелиальных клетках кровеносных капилляров, эпителиальных клетках выводных протоков, так и в ацинарных клетках ПЖ (рис. 4). Количество *TUNEL*-положительных клеток в десятки раз превышало этот показатель у молодых животных с экспериментальным СД.

Воздействие *PEI-pDNA* комплекса на организм молодых мышей с экспериментальным СТЦ-индуцированным СД характеризовалось относительной сохранностью структуры экзокринной части ПЖ и более выраженными изменениями структуры ПО. Они имели преимущественно округлую или несколько вытянутую форму, отмечалось большое количество инсулоцитов, имеющих светлую эозинофильную цитоплазму и округлое, с мелкими глыбками хроматина ядро. При окраске гистологических срезов ПЖ *A-F* по Гомори в большинстве ПО выявлялись β -инсулоциты с *A-F*-позитивными цитоплазматическими гранулами. Число таких клеток в ПО не превышало 30–40 % общего числа всех инсуло-

цитов, образующих ПО. Это было значительно меньше, чем в группе контроля, но заметно больше, чем у мышей с экспериментальным СТЦ-индуцируемым СД (см. рис. 3). Вместе с тем, в ПО часто встречались единичные β -инсулоциты, у которых весь объем цитоплазмы был заполнен $A-F$ -позитивными секреторными гранулами, а также многочисленные клетки, у которых цитоплазма содержала единичные $A-F$ -позитивные секреторные гранулы или небольшое их количество. Все это усиливало морфологическую гетерогенность ПЖ при экспериментальном СД и его коррекции с помощью генной терапии.

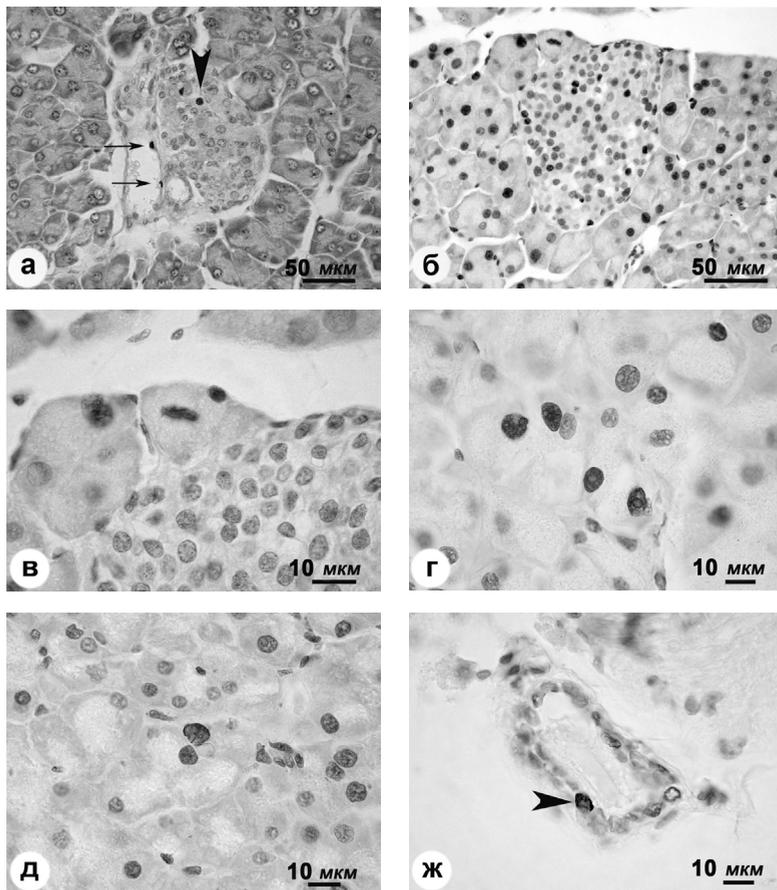


Рис. 4. Апоптоз клеток в поджелудочной железе молодых (а) и старых (б, в, г, д, ж) мышей с СТЦ-индуцированным СД: а — апоптоз инсулоцитов в панкреатических островках (▼) и эндотелия кровеносных капилляров (→); б — апоптоз инсулоцитов в панкреатических островках и ацинарных клеток ПЖ; в — митоз ацинарной клетки; г, д — апоптоз ацинарных клеток ПЖ; ж — апоптоз эпителия выводного протока ПЖ (►). Метод *TUNEL*.

При введении плазмидного комплекса молодым мышам с экспериментальным СД уровень апоптоза в ПЖ оказался ниже, чем у животных, не получавших соответствующего лечения. Если количество *TUNEL*-положительных клеток в группе СД составляло 3,25 на 1 ПО, то в группе СД + *PEI-pDNA*-комплекс — 1,22.

Вместе с этим при коррекции СТЦ-индуцированного СД с помощью *PEI-pDNA*-комплекса отмечали заметное по сравнению с СТЦ-индуцированным СД увеличение общего количества ПО в 1 мм² площади среза ПЖ, что характеризовалось значительным увеличением минимальных и максимальных значений этого показателя — от 0,34 до 1,04. При этом показатель *Me* (Q_{25} ; Q_{75}) был на уровне 0,54 (0,44; 0,57), что значимо ($P_u < 0,05$) отличало эту группу от мышей контрольной группы и мышей с СТЦ-индуцированным СД (см. рис. 2).

При коррекции СТЦ-индуцированного СД с помощью *PEI-pDNA* комплекса в ПЖ молодых мышей заметно возрастала удельная площадь эндокринной ткани в общем объеме ПЖ, о чем свидетельствовали колебания этого показателя в пределах минимальных и максимальных значений — от 0,21 усл. ед. до 0,86 усл. ед. Это предопределяло значение *Me* (Q_{25} ; Q_{75}) на уровне 0,42 (0,22; 0,53), который статистически значимо ($P_u < 0,05$) превышал аналогичный в группе мышей с СД, но при этом был меньше, чем в группе контроля (см. рис. 2).

При коррекции СТЦ-индуцированного СД с помощью *PEI-pDNA*-комплекса удельный объем β -клеток в общем объеме ПО заметно увеличивался, обнаруживая статистически значимые ($P_u < 0,05$) отличия как по сравнению с контролем, так и с группой животных с экспериментальным СТЦ-индуцированным СД (см. рис. 3).

Таким образом, гистологические изменения в ПЖ мышей при воздействии СТЦ характеризуются выраженным отёком соединительнотканной стромы органа, нарушением кровообращения (преимущественно в сосудах микроциркуляторного русла), уменьшением количества и размеров ПО, дистрофией ацинарных клеток экзокринного аппарата железы, а также β -инсулоцитов, снижением их удельного объема в общем объеме ПО, что сопровождалось нарушением синтеза и секреции инсулина, и, как следствие, развитием экспериментального СД. При этом значительно повышался уровень апоптоза в ПЖ, что было особенно демонстративно у старых животных, у которых альтеративные изменения во всех компонентах органа оказались значительно более выраженными.

Структурные изменения в ПЖ молодых мышей с экспериментальным СТЦ-индуцированным СД, которые подвергались воздействию *PEI-pDNA*-комплекса, характеризуются полной сохранностью ацинарной структуры экзокринной части ПЖ, умеренно выраженным отёком соединительнотканной стромы органа и полнокровием кровеносных сосудов, а также заметным увеличением количества функционально активных ПО по сравнению с группой животных с СТЦ-индуцированным СД. Это проявлялось сохранностью формы и линейных размеров ПО, а также присутствием в островках до 40 % β -инсулоцитов, которые содержали в своей цитоплазме большое или умеренное количество *A-F*-по-

зитивных секреторных гранул. При этом в ПЖ несколько снижался уровень апоптоза.

Морфометрические исследования показали, что у мышей с СТЦ-индуцированным СД по сравнению с контролем в ПЖ существенно снижалось количество ПО в общем объеме ткани ПЖ, которое, одновременно сопровождалось уменьшением удельного объема ПО и снижением в них функциональной (синтетической и секреторной) активности β -клеток. Вместе с этим в результате коррекции СТЦ-индуцированного СД с помощью *PEI-pDNA*-комплекса в ПЖ молодых мышей наблюдалось заметное увеличение количества ПО в общем объеме ткани ПЖ, сопровождающееся не только заметным увеличением удельного объема ПО, но и увеличением функциональной активности β -клеток.

Таким образом, применение генной терапии при экспериментальном СТЦ-индуцированном СД можно считать достаточно перспективным направлением, требующим дополнительных исследований.

Список использованной литературы

1. Квитницкая-Рыжова Т. Ю., Ступина А. С., Хаблак Г. В. и др. Возрастные особенности проявлений апоптоза в гисто-гематических барьерах различных органов при экспериментальном сахарном диабете // Пробл. старения и долголетия. — 2010. — **19**, № 4. — С. 329–338.
2. Коуэлл Дж. А. Сахарный диабет. Новое в лечении и профилактике; пер. с англ. — М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. — 288 с.
3. Топорова О. К., Кириленко С. Д., Гродов Д. М., Кордюм В. А. Плазмідний вектор для доставки гена препроінсуліну людини в клітини ссавців // Біополімери і клітина. — 2007. — **23**, № 2. — С. 100–107.
4. Akirav E., Kushner J. A., Herold K. C. Beta-cell mass and type 1 diabetes: going, going, gone? // Diabetes. — 2008. — **57**. — P. 2883–2888.
5. Butler A. E., Galasso R., Meier J. J. et al. Modestly increased beta cell apoptosis but no increased beta cell replication in recent-onset type 1 diabetic patients who died of diabetic ketoacidosis // Diabetologia. — 2007. — **50**. — P. 2323–2331.
6. Chen L., Magliano D. J., Zimmet P. Z. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus — present and future perspectives // Nat. Rev. Endocrinol. — 2011. — **8**, № 4. — P. 228–236.
7. Coppieters K. T., von Herrath M. G. Histopathology of type 1 diabetes: Old paradigms and new insights // Rev. Diabet. Stud. — 2009. — **6**, № 2. — P. 85–96.
8. Lee S. C., Pervaiz S. Apoptosis in the pathophysiology of diabetes mellitus // Int. J. Biochem. Cell Biol. — 2007. — **39**, № 3. — P. 497–504.
9. Meier J. J., Bhushan A., Butler A. E. et al. Sustained beta cell apoptosis in patients with long-standing type 1 diabetes: indirect evidence for islet regeneration? // Diabetologia. — 2005. — **48**. — P. 2221–2228.
10. Sherry N. A., Kushner J. A., Glandt M. et al. Effects of autoimmunity and immune therapy on beta-cell turnover in type 1 diabetes // Diabetes. — 2006. — **55**. — P. 3238–3245.
11. Yamagishi S., Matsui T. Advanced glycation end products, oxidative stress and diabetic nephropathy // Oxid. Med. Cell. Longev. — 2010. — **3**, № 2. — P. 101–108.

Поступила 15.11.2015

**ВПЛИВ ГЕННОЇ ТЕРАПІЇ
НА МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ОСОБЛИВОСТІ
ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ
ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТИ**

**Т. Ю. Квітницька-Рижова, С. П. Луговський,
П. П. Клименко, Г. В. Хаблак, С. П. Малишева, О. К. Топорова***

Державна установа "Інститут геронтології
ім. Д. Ф. Чеботарьова НАМН України", 04114 Київ

*Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, 03143 Київ

На моделі стрептозоточиніндукованого цукрового діабету (ЦД) у молодих (3–5 міс) і старих (18–20 міс) мишей за допомогою світлооптичних, гістохімічних і морфометричних досліджень відзначено комплекс альтеративних змін панкреатичних ostrivciv (ПО), що свідчить про розвиток дистрофічних процесів і зниження функціональної (синтетичної та секреторної) активності β-клітин, а також про посилення інтенсивності апоптозу, що було особливо демонстративним у старих тварин. При введенні молодим тваринам із ЦД плазмідного комплексу *PEI-pDNA*, що несе ген препроінсуліну, виявлено певну нормалізацію структури підшлункової залози (ПЗ) і зниження інтенсивності апоптозу (зменшення кількості *TUNEL*-позитивних клітин). Відбувається збільшення загальної кількості ПО, а також їх питомого об'єму в загальному об'ємі тканини ПЗ, що поєднується зі збільшенням питомого об'єму функціонально активних β-клітин (з альдегід-фуксин позитивною цитоплазмою) в загальному об'ємі ostrivciv, порівняно з такими показниками у тварин із ЦД, яким не була введена плазмідна. Хоча застосування генної терапії не приводило до повернення цих показників до рівня контрольної групи, тим не менш, відзначена чітка тенденція до їх нормалізації, що корелює із нормалізацією показників концентрації глюкози в крові експериментальних тварин, яким вводився плазмідний комплекс.

**THE EFFECT OF GENE THERAPY
ON MORPHO-FUNCTIONAL PECULIARITIES
OF THE PANCREAS IN EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS**

**T. Yu. Kvitnitskaia-Ryzhova, S. P. Lugovskoy, P. P. Klimenko, G. V. Khablak,
S. P. Malysheva, E. K. Toporova***

State Institution "D. F. Chebotarev Institute of Gerontology NAMS Ukraine",
04114 Kyiv

*Institute of Molecular Biology and Genetics NAS Ukraine, 03143 Kiev

The results of light-optic, histochemical and morphometric investigations using modeling streptozotocin-induced diabetes mellitus (DM) in young (3–5 mo.) and old (18–20 mo.) mice

revealed changes in the pancreatic islets (PI) evidencing for the development of dystrophic processes and decrease of functional (synthetic and secretory) activities of β -cells as well as for enhanced intensity of the apoptosis, being more demonstrative in the old animals. The injection of experimental plasmid complex PEI-pDNA carrying preproinsulin gene to the young mice with DM resulted in the certain normalization of organization of the pancreatic gland (PG) structure and decrease of apoptosis intensity, namely: decrease of the number of TUNEL-positive cells. The total number of PI and their specific volume in overall PG tissue volume were increased, having been combined with increase of specific volume of the functionally active β -cells (with aldehyde-fuchsin positive cytoplasm) in the overall volume of islets, as compared with similar indices in the DM animals with no plasmid injected. Although the use of gene therapy did not lead to the return of these indices to the level of control animals, there was a clear tendency to their normalization, which correlated with normalization of the blood glucose concentration in the experimental animals following administration of plasmid complex.

Сведения об авторах

ГУ "Институт геронтологии им. Д. Ф. Чеботарева НАМН Украины"

Лаборатория морфологии и цитологии

Т. Ю. Квитницкая-Рыжова — зав лаб., д.б.н., профессор (sam@geront.kiev.ua)

С. П. Луговской — с.н.с., д.м.н.

П. П. Клименко — с.н.с., к.б.н.

Г. В. Хаблак — с.н.с., к.б.н.

С. П. Малышева — с.н.с., к.б.н.

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины

Е. К. Топорова — с.н.с. отдела регуляторных механизмов клетки