

**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 МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ У МЫШЕЙ РАЗНОГО ВОЗРАСТА

Проведено сравнительное исследование у молодых (3–5 мес) и старых (18–20 мес) мышей возрастных морфологических, гистохимических и морфометрических особенностей, а также проявлений апоптоза в поджелудочной железе (ПЖ) при моделировании стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета (СД) и его коррекции с помощью генной терапии (ГТ) — плазмидным комплексом *PEI-pDNA*, несущим ген препроинсулина. У молодых животных в результате коррекции СД с помощью ГТ наблюдалась некоторая нормализация структурной организации ПЖ, увеличение количества панкреатических островков (ПО), сопровождающееся не только увеличением их удельного объема в ткани ПЖ, но и увеличением функциональной активности β -клеток (синтетической и секреторной), а также снижением уровня апоптоза (уменьшением количества *TUNEL*-положительных клеток), что сочеталось с определенной нормализацией концентрации глюкозы в крови. Все это свидетельствует об эффективности применения ГТ при СД в этой возрастной группе. У старых животных в группе СД + ГТ отмечалось нарастание деструктивно-дистрофических изменений ПЖ, уменьшение количества ПО и их удельного объема в ткани ПЖ, незначительное увеличение удельного объема функционально активных β -клеток (с альдегид-фуксин положительной цитоплазмой), а также повышение уровня апоптоза. Если при моделировании СД морфофункциональные изме-

нения в ПЖ молодых и старых животных были преимущественно однонаправленными (хотя степень их выраженности была значительно выше у старых), то при коррекции СД с помощью ГТ по ряду показателей они оказались разнонаправленными. У молодых наблюдалась определенная нормализация изученных признаков, а у старых — значительное их ухудшение, что приводило к нарастанию альтеративных изменений, развитию патологических процессов, а также усилению интенсивности апоптотической гибели клеток. Возникновение у старых животных в условиях данной экспериментальной модели острого инсулита явилось грозным симптомом, указывающим на возрастную специфику реактивности ПЖ и на необходимость учитывать возрастной фактор при разработке терапевтической стратегии лечения СД.

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

Сахарный диабет (СД) является распространенным, многофакторным, возрастзависимым заболеванием, сопровождающимся многочисленными осложнениями. Его распространенность среди людей 20–79 лет по некоторым оценкам составляла к 2010 году 6,4 %, охватывая 285 млн человек, а к 2030 г. прогнозируется увеличение этих показателей до 7,7 % и 439 млн заболевших [17]. Особое значение приобретает возрастной аспект этой проблемы. Во-первых, распространенность СД существенно увеличивается с возрастом, пик заболеваемости приходится приблизительно на 60 лет. Во многих западных странах он встречается примерно у 10–20 % лиц старше 65 лет [4]. Учитывая прогнозируемое постарением населения, очевидно, что доля больных пожилого возраста будет неуклонно увеличиваться. Во-вторых, ряд проявлений СД по своим морфологическим характеристикам напоминает типичные возрастные изменения, наступающие при нормальном физиологическом старении, а возрастные морфо-функциональные изменения, развивающиеся в старости, являются основой диабетических повреждений [2, 3]. Кроме того, различные терапевтические влияния при СД могут иметь различную эффективность в разном возрасте.

В большинстве случаев СД (I типа) обусловлен аутоиммунным повреждением β -клеток панкреатических островков (ПО) (или разнообразными токсическими влияниями на эти клетки), что приводит к их частичной гибели (путем апоптоза или некроза) и, как следствие, к существенному снижению секреции инсулина [9, 11, 14, 16]. Как известно, основным физиологическим регулятором секреции инсулина является глюкоза. Исследования на культуре клеток ПО, как животных, так и человека, показали, что краткосрочное влияние повышенной концентрации глюкозы на β -клетки индуцирует их пролиферацию, а долгосрочное — подавляет пролиферативную активность и вызывает их апоптоз [8, 13]. Хроническая гипергликемия активизирует оксидативный стресс, провоцируя гене-

рацию свободных радикалов, что оказывает пагубное влияние на структуру и функцию клеток и их мембран. Патогенетические механизмы повреждения клеток ПЖ и внутренних органов при СД достаточно многообразны и включают оксидативный стресс, гипоксию, нарушение метаболизма кальция, увеличение апоптотической активности, а также развитие воспалительного процесса в ПО [6, 7, 9].

Моделирование этого заболевания (введение экспериментальным животным стрептозотоцина (СТЦ), оказывающего токсическое воздействие на β -клетки) позволяет изучить клеточные механизмы развития этой патологии в том числе и в разные возрастные периоды, а также с помощью объективных морфо-функциональных критериев оценить эффективность корректирующих влияний в разном возрасте. Одним из наиболее существенных критериев является интенсивность апоптоза в клетках поджелудочной железы (ПЖ) и внутренних органов в разном возрасте, что отражает как тяжесть заболевания, так и эффективность его лечения [2, 10, 13].

Среди работ, посвященных поиску новых подходов к лечению СД, особый интерес привлекают исследования в области генной терапии. В отделе регуляторных механизмов клетки (зав. — акад. НАМН Украины В. А. Кордюм) Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины был сконструирован эукариотический вектор экспрессии гена препроинсулина человека для последующей доставки в неэндокринные клетки млекопитающих с целью разработки экспериментальной генной терапии диабета I типа [5]. Последовательность гена препроинсулина человека высокоомологична последовательности гена препроинсулина экспериментальных животных, а также обладает высокой внутренней гомологией в связи с присутствием множественных коротких повторов [5].

В нашей предыдущей работе были представлены результаты исследования морфо-функциональных особенностей ПЖ при моделировании СТЦ-индуцированного СД с последующим введением плазмидного комплекса *PEI-pDNA*, несущего ген препроинсулина, у молодых мышей [1]. При этом были отмечены определенная нормализация структурной организации ПЖ, стремление к контрольным величинам таких показателей, как количество ПО на единицу площади и удельный объем эндокринной ткани в общем объеме ПЖ (резко уменьшавшихся при СД), увеличение функциональной активности β -клеток (также сниженной при СД). Кроме того, несколько снижался уровень апоптоза, который значительно возрастал при моделировании СД.

Особый интерес представляет изучение аналогичных параметров в старших возрастных группах, что необходимо для выяснения возрастных особенностей исследуемых процессов, в частности оценки эффективности генной терапии у старых животных.

Целью настоящей работы явилось сравнительное исследование (у молодых и старых мышей) возрастных морфологических, гистохимических и морфометрических особенностей, а также проявлений апоптоза, в ПЖ при моделировании СТЦ-индуцированного 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 0,1 М цитратном буфере (рН 5). Развитие гипергликемии контролировали с помощью глюкометра (*Accu-Chek Active*, Германия). Забор крови из ретроорбитального венозного синуса производили натошак с помощью микрокапилляров. 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-мес. и 18–20-мес.) подвергалась генной терапии плазмидным комплексом *PEI-pDNA*, содержащим ген препроинсулина. Через 4 недели после развития устойчивого диабета в печень животных вводили раствор, содержащий плазмидный вектор (10 мкг плазмидной ДНК на животное) для доставки гена препроинсулина человека, который был получен в отделе регуляторных механизмов клетки Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины. Процедура введения препарата подробно описана в нашей предыдущей статье [1].

Плазида со встроенным геном препроинсулина человека, преципитированная полиэтиленимином (ПЭИ), 25кД, готовилась *ex tempore* за 10 мин до введения. Объем преципитированной ДНК — 90 мкл, содержание плазмидной ДНК в препарате составляет 10 мкг (на одно животное), весовое соотношение ДНК/ПЭИ составляло 1:2. Перед введением препарата ДНК животных выдерживали на голоде в течение 4 ч. После наркотизирования (смесь 5 % кетамина с ксилозином — 1:10, по 100–150 мкл, в зависимости от массы тела животного) делали разрез размером 1 см чуть ниже левого подреберья (сначала кожи, а затем брюшины). В поле зрения была отчетливо видна нижняя часть печени, в частности, ее большая доля, в которую вводили препарат ДНК инсулиновым шприцем 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 СД) и контрольная группа мышей получали физиологический раствор в том же объеме.

На 30-е сутки после введения плазмиды животных выводили из эксперимента. Использовано 12 контрольных мышей (7 молодых и 5 старых), 16 со СТЦ-индуцированным СД (10 молодых и 6 старых) и 12 (6 молодых и 6 старых) со СТЦ-индуцированным СД, получавших плазмиду с геном препроинсулина человека. ПЖ изучали с помощью стандартных гистологических методов — фиксировали в фиксаторе Буэна, обезживали по стандартной методике в растворах этанола возрастающей концентрации и заключали в парафин (*Richard-Allan Scientific*, тип 6, США). Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином, а также альдегид-фуксином (*A-F*) 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* (Япония) с

программным обеспечением *Olympus DP-Soft 3.2*. Во всех изученных группах экспериментальных животных (контроль, СД, СД + PEI-pDNA – в двух возрастных группах) 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 в ПЖ выявляли с помощью иммуногистохимического варианта TUNEL-метода с использованием коммерческих наборов (*ApopTag® Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit, Chemicon, США*), что подробно описано в нашей предыдущей статье [1]. Для количественной оценки выраженности апоптоза вычисляли количество TUNEL-положительных ("+") клеток в 1 мм² среза ПО. Статистический анализ проводили методом непараметрической статистики с использованием модулей "Excel" и программного продукта "STATISTICA 6,0" Stat Soft inc., а проверку статистических гипотез – с помощью критерия *U* Вилкоксона – Манна – Уитни.

Результаты и их обсуждение. Эффекты введения СТЦ при моделирования СД, а также коррекции этого заболевания с помощью генной терапии (ГТ) у молодых и старых животных выявляли путем определения концентрации глюкозы в сыворотке крови. Последнее исследование концентрации глюкозы в крови проводили непосредственно перед выводом животных из эксперимента (таблица). При экспериментальном СД в обеих возрастных группах уровень этого показателя повышался более чем в три раза, (причем у молодых несколько больше, чем у старых), что соответствовало развитию у них стойкой гипергликемии. При введении PEI-pDNA-комплекса, несущего ген препроинсулина, концентрация глюкозы в крови снижалась у молодых животных почти в три раза, приближаясь к показателям контроля, а у старых – приблизительно в два раза, оставаясь несколько повышенной.

Концентрация глюкозы в крови мышей разного возраста на заключительном этапе эксперимента, ммоль/л

Группа	<i>Me</i>	<i>min</i>	<i>max</i>
Молодые мыши			
Контроль, <i>n</i> = 7	4,7	4,10	6,20
СД, <i>n</i> = 10	18,6*	15,7	21,5
СД+ГТ, <i>n</i> = 6	6,45*#	4,5	8,6
Старые мыши			
Контроль, <i>n</i> = 5	4,85	4,1	5,3
СД, <i>n</i> = 6	14,9* ^α	13,8	18,4
СД+ГТ, <i>n</i> = 6	8,4*# ^α	6,2	10,0

Примечания: * – $P \leq 0,05$ по сравнению с контрольной группой данного возраста, # – $P \leq 0,05$ по сравнению с группой СД данного возраста, ^α – $P \leq 0,05$ по сравнению с группой молодых мышей.

Гистологические исследования ПЖ молодых и старых животных при моделировании СД

В условиях моделирования СД у старых животных отмечены более выраженные структурные изменения всех компонентов ПЖ, чем у молодых — отек соединительнотканной стромы органа и ее лимфоцитарная инфильтрация, расширение просветов и полнокровие кровеносных капилляров, расширение просветов протоков, уменьшение размеров и нарушение цитоархитектоники ПО, а также дистрофические изменения экзокринной и эндокринной части железы (рис. 1а). Дистрофические и деструктивные изменения в клетках инсулярного аппарата ПО также оказались более выраженными, чем у молодых. В инсулоцитах отмечали просветление цитоплазмы, ее вакуолизацию и пикноз ядер. Альтеративные изменения отдельных инсулоцитов, их цитолиз и кариолиз, наблюдались чаще, чем у молодых животных с СД, гораздо сильнее снижалось количество функционально активных клеток, окрашенных *A-F* по Гомори (рис. 1б). Была отмечена большая, чем у молодых с СД, лимфоцитарная инфильтрация ПО, чаще встречался очаговый склероз, а также кистообразование на месте погибших островков. Более выраженные процессы деструкции у старых животных при СД сочетались с большей интенсивностью клеточной гибели (инсулоцитов, эндотелиальных клеток кровеносных капилляров, эпителиальных клеток выводных протоков, а также ацинарных клеток ПЖ). Количество *TUNEL*-положительных клеток в десятки раз превышало этот показатель у молодых животных с СД.

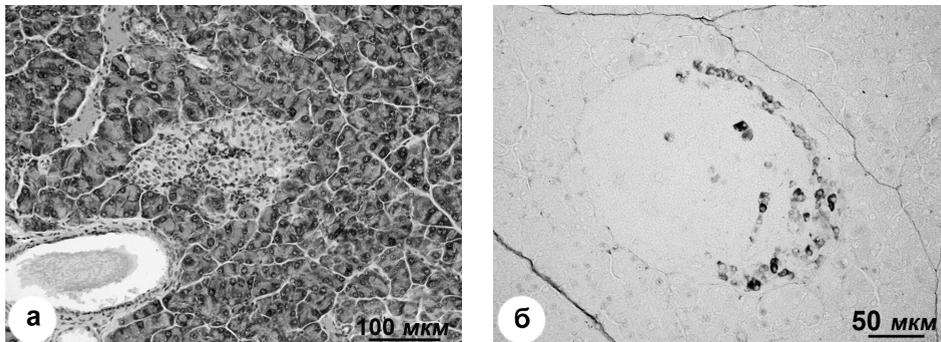


Рис. 1. Структурные изменения ПЖ старых мышей при СД: а — резко выраженное полнокровие кровеносных сосудов сопровождается дистрофическими изменениями экзокринной и эндокринной ткани ПЖ; б — резкое снижение количества инсульцитов с *A-F*-позитивными секреторными гранулами в ПО. Гематоксилин и эозин (а), *A-F* по Гомори (б).

Отмеченные нами возрастные структурные и гистохимические изменения в ПЖ при моделировании СДЦ-индуцированного СД хорошо коррелировали с результатами морфометрии ПО. У молодых животных с СД было отмечено уменьшение размеров островков, что сочеталось со снижением их общего количества на единицу площади (рис. 2). Этот показатель был близок к аналогичному показателю старых контрольных животных,

что еще раз подтверждает определенное сходство некоторых проявлений СД с возрастными изменениями, развивающимися при старении [2, 3]. Интересно, что у старых животных с СД не происходило дальнейшего снижения количества островков, однако разброс этого показателя несколько увеличивался по сравнению со старыми контрольными животными.

Количество ПО на единицу площади тесно связано с показателем удельного объема ПО в общем объеме ткани ПЖ. Лишь совместная оценка этих параметров позволяет судить о функциональных возможностях эндокринной части ПЖ. У молодых животных при моделировании СД этот показатель резко снижался (рис. 2). У старых контрольных животных он был также ниже, чем у молодых, и характеризовался значительно большим разбросом. При моделировании СД у старых происходило резкое снижение этого показателя, сопоставимое с таковым у молодых животных с СД. Следовательно, хотя у старых животных с СД количество ПО на единицу площади существенно не снижалось, преобладали мелкие и очень мелкие островки, удельный объем которых в общем объеме ткани ПЖ был значительно меньшим, чем в контроле, что отражает атрофические изменения эндокринной ткани ПЖ.

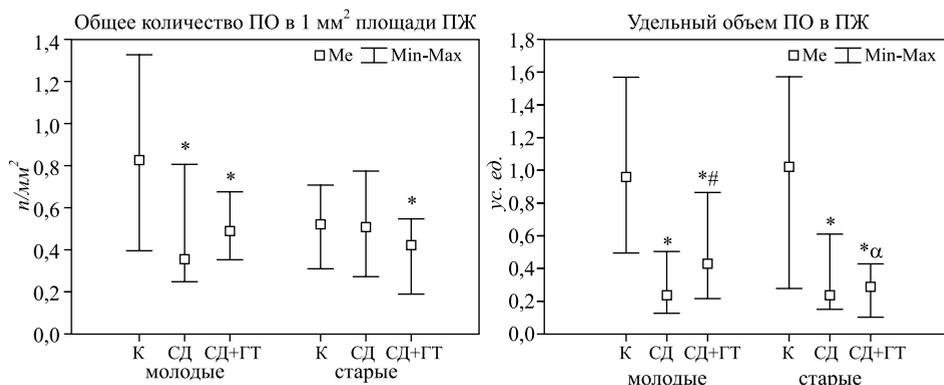


Рис. 2. Изменения морфометрических характеристик ПО молодых и старых мышей при СД и СД + ГТ по сравнению с контролем. * — $P \leq 0,05$ по сравнению с контрольной группой данного возраста, # — $P \leq 0,05$ по сравнению с группой СД данного возраста, α — $P \leq 0,05$ по сравнению с группой молодых мышей.

Наши данные хорошо согласуются с данными литературы, демонстрирующими четкую корреляцию между повышением уровнем апоптоза β -клеток и снижением размеров площади, занятой этими клетками, у больных СД [10]. Число TUNEL-положительных β -клеток в 4,5 раза превышало аналогичный показатель у людей, не имевших этой патологии, а площадь ПО, занятая β -клетками, оказалась значительно меньше, чем в контроле. Таким образом, уменьшение количества ПО (или их размеров) и снижение их удельного объема в общем объеме ткани ПЖ, отмеченные нами при экспериментальном СД у животных

обеих возрастных групп, по-видимому, отражают процессы атрофии островков, в основе которой лежат клеточные повреждения, ведущие к апоптотической гибели β -клеток.

Важным показателем функциональной активности ПО является содержание инсулоцитов с *A-F*-положительными секреторными гранулами в цитоплазме (рис. 3). Существуют исследования, в которых отмечена определенная зависимость между степенью снижения интенсивности *A-F*-окрашивания инсулоцитов ПО и уровнем глюкозы в крови при СТЦ-индуцированном СД [16]. В группе животных с более низким уровнем глюкозы этими авторами выявлялось незначительное *A-F*-окрашивание ПО, а в группе с самыми высокими показателями — отмечено практически полное его отсутствие.

Отмеченное нами резкое снижение удельного объема таких клеток в общем объеме ПО при экспериментальном СД у молодых животных явилось проявлением снижения синтетической и секреторной активности β -клеток при этой патологии. Вместе с этим в β -инсулоцитах заметно снижается и общее количество содержащихся в цитоплазме *A-F*-позитивных секреторных гранул, что свидетельствует о нарушении процессов синтеза и секреции инсулина в этих клетках. У старых контрольных животных удельный объем инсулоцитов с *A-F*-положительной цитоплазмой изменялся незначительно по сравнению с молодыми, хотя разброс этого показателя оказался большим, что отражает гетерогенность морфологических признаков, характерную для процесса старения. Однако при моделировании СД его снижение у старых животных выявилось значительно большим, чем у молодых, отражая более глубокие деструктивно-дистрофические процессы, развивающиеся в ПО при этой патологии в старости, являясь количественным выражением результатов, полученных при качественном анализе.

Однако последней стадией всего комплекса функциональных изменений и разнообразных повреждений, отмеченных при моделировании СД, является клеточная гибель, что позволяет считать ее одним из наиболее объективных критериев характера и тяжести заболевания, а также эффективности его лечения [2, 6, 9, 10]. Применение *TUNEL*-метода позволило нам выявить значительные изменения уровня апоптоза как при старении, так и при моделировании экспериментальной патологии, а также ее коррекции (рис. 4). Количества *TUNEL*-положительных инсулоцитов в ПО старых животных в десятки раз превышало их количество у молодых, отражая процессы деструкции, развивающиеся в старости. Количество этих клеток у старых контрольных животных оказалось сопоставимым с этим показателем у молодых с СД, что еще раз подтверждает определенное сходство между морфологическими проявлениями диабетических повреждений и типичными возрастными изменениями [2, 3]. При СД происходило резкое увеличение количества *TUNEL*-положительных инсулоцитов в ПО в обеих возрастных группах, однако у старых этот показатель оказался в два раза больше, чем у молодых (10,1 *TUNEL*"+"-клеток/1 мм² — у молодых и 21,4 *TUNEL*"+"-клеток/1 мм² — у старых). Это свидетельствует об усилении процесса клеточной гибели при моделировании изучаемой па-

тологии, что гораздо более выражено у старых, чем у молодых. Являясь следствием глубоких метаболических нарушений и необратимых деструктивных изменений клеток, именно клеточная гибель, в какой-то мере, становится причиной снижения удельного объема эндокринной ткани в общем объеме ПЖ и снижения количества активно функционирующих клеток в ПО, что было отмечено нами в большей степени у старых животных.

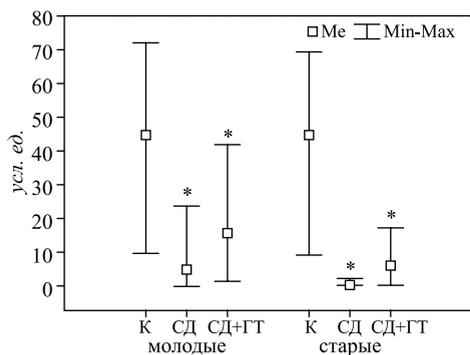


Рис. 3. Изменения удельного объема инсулоцитов с *A-F* положительными секреторными гранулами в ПО молодых и старых мышей при СД и СД+ГТ в сравнении с контролем.

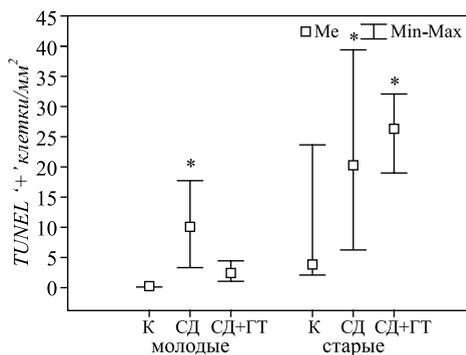


Рис. 4. Изменения уровня апоптоза в ПО молодых и старых мышей при СД и СД+ГТ в сравнении с контролем.

У старых животных морфометрические показатели ПЖ оказались изначально значительно ниже, чем у молодых, а уровень апоптоза — существенно выше, вследствие возрастных изменений этой железы. При моделировании СД они продолжали снижаться, уровень функциональной активности инсулоцитов — падать, а уровень апоптоза — возрастать, что определило значительно более глубокие структурные повреждения ПЖ, отмеченные нами в этой возрастной группе.

Гистологические исследования ПЖ молодых и старых животных при СД и генной терапии

Воздействие *PEI-pDNA*-комплекса на молодых мышей с СТЦ-индуцированным СД приводило к относительной нормализации структуры ПЖ, хотя и усиливалась гетерогенность морфологической картины. ПО имели преимущественно округлую или несколько вытянутую форму, отмечалось большое количество инсулоцитов со светлой эозинфильной цитоплазмой и округлым ядром с мелкими глыбками хроматина. При окраске гистологических срезов ПЖ *A-F* по Гомори в большинстве ПО выявлялось увеличение количества β -инсулоцитов с *A-F*-позитивными гранулами в цитоплазме. Число таких клеток в ПО не превышало 30–40 % общего числа инсулоцитов, образующих ПО. Это было меньше, чем в группе контроля, но заметно больше, чем у мышей с СД. Показатель удельного объема инсулоцитов, содержащих *A-F*-позитивные секреторные гранулы, увеличи-

вался, проявляя статистически значимые отличия по сравнению с животными с СД, не подвергавшихся генной терапии (см. рис. 3). Но особое значение приобретает тот факт, что при введении плазмидного комплекса уровень апоптоза в ПЖ оказался существенно ниже, чем у животных, не получавших соответствующего лечения (см. рис. 4).

В отличие от молодых, введение плазмидного комплекса старым животным с СД не приводило к нормализации структурной организации ПЖ. Нарастали явления отека, деструкции клеток, их вакуолизации, а также воспалительной (лимфо-лейкоцитарной) инфильтрации не только ПО, но и межучной ткани ПЖ (рис. 5а). В ряде случаев происходило частичное (или же почти полное) замещение ткани ПО лимфоцитами, в результате чего оставались лишь небольшие островки функционирующей эндокринной ткани, содержащей единичные инсулоциты, иногда — с признаками их выраженной гипертрофии (рис. 5б, 6). При этом в регионарных лимфатических узлах отмечалась гипоплазия лимфоидной ткани и большое количество макрофагов, заполненных гранулами липофусцина (рис. 5в, г).

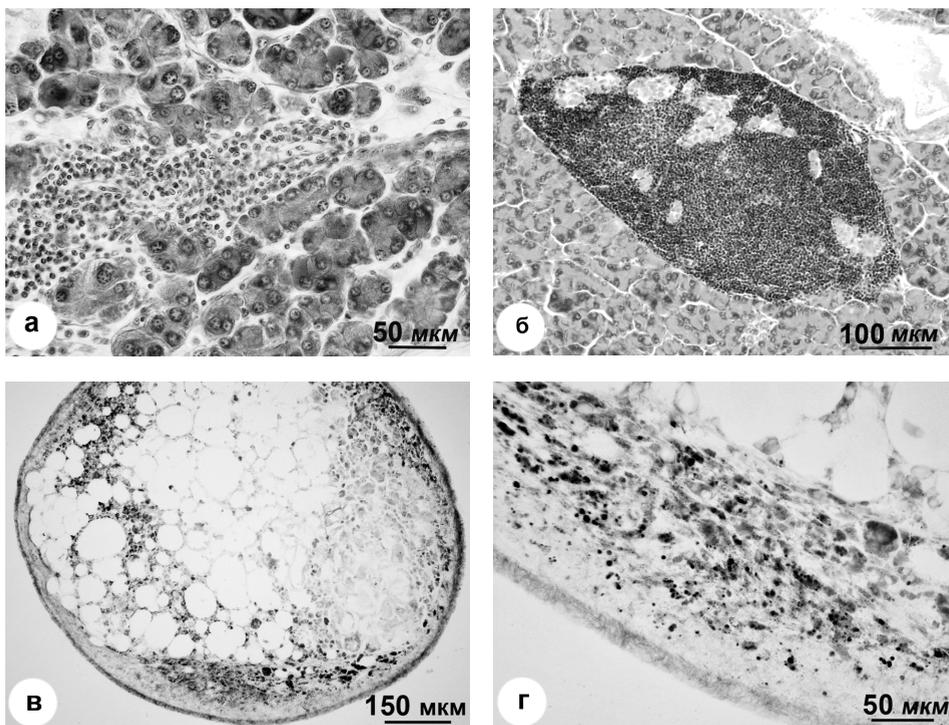


Рис. 5. Структурные изменения ПЖ и регионарных лимфатических узлов старых мышей при СД+ГТ. а — отек и выраженная лимфо-лейкоцитарная инфильтрация стромы ПЖ; б — выраженная лимфоцитарная инфильтрация ПО; в, г — гипоплазия лимфоидной ткани внутрибрюшинного лимфатического узла с расширенными краевыми синусами, в которых обнаруживаются многочисленные макрофаги, содержащие в цитоплазме гранулы липофусцина. Гематоксилин и эозин (а, б), А-Е по Гомори (в, г).

Если у молодых животных с СД введение плазмидного комплекса способствовало определенному восстановлению популяции функционально активных инсулоцитов с *A-F*-позитивными секреторными гранулами в цитоплазме, то у старых — их число возрастало незначительно. Показатель их удельного объема в группе СД + ГТ несколько увеличивался по сравнению с группой СД, но оставался значительно ниже, чем в аналогичной группе молодых животных (см. рис. 3).

Иная закономерность была выявлена при определении с помощью TUNEL-метода уровня апоптоза в ПЖ (см. рис. 4). Если у молодых животных с СД введение плазмидного комплекса приводило к существенному снижению индекса апоптоза, приближавшегося к контрольным величинам (10,11 TUNEL⁺-клеток/1 мм² — при СД; 0,96 TUNEL⁺-клеток/1 мм² — при СД + ГТ), то у старых не только не происходило снижения этого показателя, но был даже отмечен его рост (21,44 TUNEL⁺-клеток/1 мм² — при СД; 26,56 TUNEL⁺-клеток/1 мм² — при СД + ГТ). Кроме того, апоптозу подвергались не только инсулоциты ПО, но и эпителиоциты протоков, эндотелиоциты, экзокриноциты, а также лимфоциты, заполняющие островки (рис. бв, г).

Описанные изменения на клеточном уровне у старых мышей с СД и последующей генной терапией хорошо сочетались с изменениями морфометрических параметров ПО у этих животных, отражая различные стороны одного процесса. Если у молодых животных (СД + ГТ) общее количество ПО на единицу площади, изменялось, хоть и незначительно, однако стремилось к некоторому увеличению (причем, разброс этого показателя несколько уменьшался по сравнению с группой СД), то у старых (СД + ГТ) этот показатель существенно снижался по сравнению с группой СД (см. рис. 2а). Аналогичная ситуация наблюдалась и при измерении удельного объема ПО в общем объеме ткани ПЖ (см. рис. 2б). У старых животных (СД + ГТ) не только не отмечалась тенденция к его нормализации, но происходило существенное снижение по сравнению с группой СД.

Однако одной из наиболее серьезных и, в какой-то степени, неожиданных находок, выявленных в ПЖ старых животных с СД и последующей генной терапией, явилось развитие в ряде случаев сильно выраженного инсулита. Хорошо известно, что одним из существенных факторов патогенеза СД является воспалительный процесс в ПО, развивающийся в ответ на метаболический стресс [6, 7, 18]. Наблюдается инфильтрация островков иммунными клетками, преимущественно *CD8* T-лимфоцитами, значительно реже В лимфоцитами и макрофагами, а также выброс цитокинов и хемокинов. Их роль может быть двоякой — как благотворной, так и разрушительной. Например, низкие концентрации интерлейкина-1 β способствуют улучшению функции β -клеток и их выживаемости [12], а его длительное и массивное действие ингибирует эти клетки, вызывая *Fas*-зависимый апоптоз [7, 13]. Воспалительный процесс в ПО характеризуется сильной вариабельностью, что даже порождает вопрос можно ли считать инсулит отличительным признаком (объективным критерием) СД или нет [6]. Выраженность инсулита варьирует не только у разных

пациентов, на разных стадиях заболевания, в зависимости от его клинического течения, в разном возрасте, но и в различных островках [6, 15]. Было показано, что пик *CD8* T-клеточной инфильтрации соответствует уровню разрушения β -клеток и быстро исчезает, когда все функционирующие β -клетки разрушены [18].

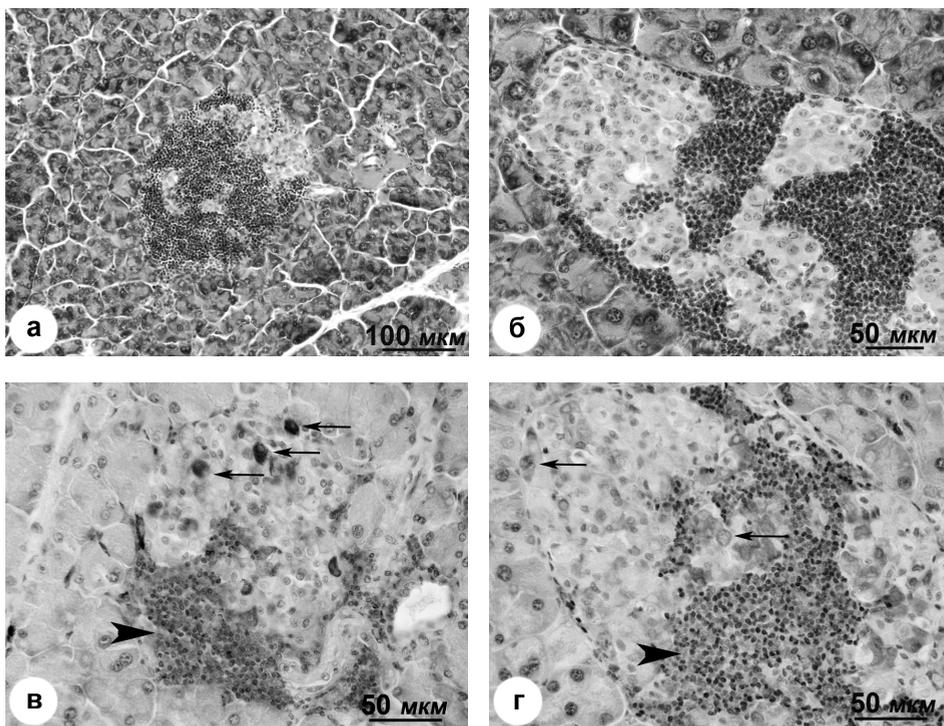


Рис. 6. Структурные изменения ПО старых мышей при СД+ГТ. а — резко выраженная инфильтрация ПО лимфоцитами с развитием инсулита; б — большая часть ПО инфильтрирована лимфоцитами с наличием небольших участков с сохранившимися инсулоцитами; в, г) — апоптоз инсулоцитов (←), а также лимфоцитов (▶), которые обильно инфильтрируют ПО. Гематоксилин и эозин (а, б); *TUNEL*-метод (в, г).

В наших исследованиях также отмечена определенная вариабельность лимфоцитарной инфильтрации ПО в условиях экспериментального СД, как у различных животных, так и в различных островках одного и того же животного, хотя можно считать, что в целом она была незначительной в обеих возрастных группах. Тем не менее, у старых животных с СД количество лимфоидных клеток в ПО оказалось выше, чем у молодых. Они располагались как по периферии островков, так и среди инсулоцитов, нередко образуя группы, иногда окружая погибающие клетки (см. рис. 1а).

Применение генной терапии при СД также продемонстрировало вариабельность этого показателя, в первую очередь у старых, поскольку

именно у них наиболее остро проявлялись эти процессы. Однако разброс этого показателя оказался значительно большим, чем в группе старых животных с СД, которым не вводился плазмидный комплекс. В ряде случаев лимфоциты заполняли практически весь ПО, оставляя лишь небольшие островки функционирующей эндокринной ткани (см. рис. 5, 6). Столь сильную реакцию, отмеченную нами у старых животных в группе СД+ГТ, можно расценить не только как реактивный аутоиммунный ответ, но и как развитие патологического процесса — острого *T*-клеточного инсулита, ингибирующего функционирование ПО. Его можно считать серьезным осложнением в ответ на воздействие генной терапии, возникающим исключительно у старых животных. У молодых — в аналогичных условиях (СД + ГТ) количество лимфоцитов в ПО оставалось незначительным, как, впрочем, и при СД.

Таким образом, у молодых животных в результате коррекции СТЦ-индуцированного СД с помощью *PEI-pDNA*-комплекса наблюдалась некоторая нормализация структурной организации ПЖ, увеличение количества ПО в ткани ПЖ, сопровождающееся не только увеличением удельного объема ПО, но и увеличением количества функционально активных β -клеток, а также снижением уровня апоптоза. Все это свидетельствует об эффективности применения ГТ при СД в этой возрастной группе. У старых животных подобной закономерности не наблюдалось — в группе СД+ГТ отмечалось нарастание деструктивно-дистрофических изменений ПЖ, снижение количества ПО и их удельного объема в ткани ПЖ, незначительное увеличение удельного объема инсулоцитов с *A-F*-позитивными секреторными гранулами в цитоплазме, а также увеличение уровня апоптоза.

Итак, если при моделировании СД морфо-функциональные изменения в ПЖ молодых и старых животных были преимущественно однонаправленными, различаясь, в основном, степенью выраженности, то при коррекции СД с помощью генной терапии по ряду показателей они оказались разнонаправленными. У молодых животных наблюдалась определенная нормализация изученных признаков, выраженная в различной мере, а у старых — значительное их ухудшение, что приводило к нарастанию альтеративных изменений, развитию патологических процессов, а также усилению апоптоза, уровень которого становился выше, чем при СД.

Возникновение у старых животных в условиях данной экспериментальной модели (в ряде случаев) острого инсулита являлось грозным симптомом, указывающим на возрастную специфику реактивности ПЖ и на необходимость учитывать возрастной фактор при разработке терапевтической стратегии лечения СД.

Список использованной литературы

1. Квитницкая-Рыжова Т. Ю., Луговской С. П., Клименко П. П. и др. Влияние генной терапии на морфо-функциональные особенности поджелудочной железы при экспериментальном сахарном диабете // Пробл. старения и долголетия. — 2015. — 24, № 3–4. — С. 226–238.

2. *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.
3. *Квитницкая-Рыжова Т. Ю., Хаблак Г. В., Ступина А. С.* и др. Возрастные ультраструктурные и ультратрихимические особенности гисто-гематических барьеров различных органов при экспериментальном сахарном диабете // Пробл. старения и долголетия. — 2011. — **20**, № 3. — С. 302–310.
4. *Колуэлл Дж. А.* Сахарный диабет. Новое в лечении и профилактике; пер. с англ. — М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. — 288 с.
5. *Топорова О. К., Кириленко С. Д., Иродов Д. М., Кордюм В. А.* Плазмидный вектор для доставки гена препроинсулина людини в клітини ссавців // Біополімери і клітина. — 2007. — **23**, № 2. — С. 100–107.
6. *Coppieters K. T., von Herrath M. G.* Histopathology of type 1 diabetes: Old paradigms and new insights // Rev. Diabetic Studies. — 2009. — **6**, № 2. — P. 85–96.
7. *Donath M. Y., Schumann D. M., Faulenbach M.* et al. Islet inflammation in type 2 diabetes // Diabetes Care. — 2008. — **31**, Suppl. 2. — P. S161–S164.
8. *Federici M., Hribal M., Perego L.* et al. High glucose causes apoptosis in cultured human pancreatic islets of Langerhans: a potential role for regulation of specific Bcl family genes toward an apoptotic cell death program // Diabetes. — 2001. — **50**, № 6. — P. 1290–1301.
9. *Haligur M., Topsakal S., Ozmen O.* Early degenerative effects of diabetes mellitus on pancreas, liver and kidney in rats: an immunohistochemical study // Exp. Diabetes Res. — 2012. — doi: 10.1155/2012/120645.
10. *Jurgens C. A., Toukatly M. N., Fligner C. L.* et al. β -cell loss and β -cell apoptosis in human type 2 diabetes are related to islet amyloid deposition // Am. J. Pathol. — 2011. — **178**, № 6. — P. 2632–2640.
11. *Kinkar S. B., Patil K. G.* Histological structure of pancreas in normal control, diabetic control and extract treated albino rats // Int. J. Life Sci. — 2016. — **4**, № 1. — P. 78–82.
12. *Maedler K., Schumann D. M., Sauter N.* et al. Low concentration of interleukin-1 beta induces FLICE-inhibitory protein-mediated beta-cell proliferation in human pancreatic islets // Diabetes. — 2006. — **55**, № 10. — P. 2713–2722.
13. *Maedler K., Spinas G. A., Lehmann R.* et al. Glucose induces beta-cell apoptosis via upregulation of the Fas-receptor in human islets // Diabetes. — 2001. — **50**, № 8. — P. 1683–1690.
14. *Mathis D., Vence L., Benoist C.* β -cell death during progression to diabetes // Nature. — 2001. — **414**, № 6865. — P. 792–798.
15. *Muraio S., Imagawa A., Kawasaki E.* et al. Pancreas histology and a longitudinal study of insulin secretion in a Japanese patient with latent autoimmune diabetes in adults // Diabetes Care. — 2008. — **31**, № 10. — doi: 10.2337/dc08-1082.
16. *Ozdemir O., Akalin P. P., Baspinar N.* et al. Pathological changes in the acute phase of streptozotocin-induced diabetic rats // Bull. Vet. Inst. Pulawy. — 2009. — **53**. — P. 783–790.
17. *Shaw J. E., Sicree R. A., Zimmet P. Z.* Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030 // Diabetes Res. Clin. Prac. — 2010. — **87**, № 1. — P. 4–14.
18. *Willcox A., Richardson S. J., Bone A. J.* et al. Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes // Clin. Exp. Immunol. — 2009. — **155**, № 2. — P. 173–181.

Поступила 26.06.2016

**ВПЛИВ ГЕННОЇ ТЕРАПІЇ НА МОРФОЛОГІЧНІ
ПОКАЗНИКИ ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ
ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТИ
У МИШЕЙ РІЗНОГО ВІКУ**

**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

Проведене порівняльне дослідження у молодих (3–5 міс) і старих (18–20 міс) мишей вікових морфологічних, гістохімічних і морфометричних особливостей, а також проявів апоптозу, в підшлунковій залозі (ПЗ) при моделюванні стрептозотозин-індукованого цукрового діабету (ЦД) та його корекції за допомогою генної терапії (ГТ) – плазмідним комплексом *PEI-pDNA*, що несе ген препроінсуліну. У молодих тварин з ЦД в результаті корекції ЦД за допомогою ГТ спостерігалась певна нормалізація структурної організації ПЗ, збільшення загальної кількості панкреатичних островців (ПО), що супроводжувалось не тільки збільшенням їх питомого об'єму в загальному об'ємі тканини ПЗ, але й збільшенням функціональної активності β-клітин (синтетичної і секреторної), а також зниженням інтенсивності апоптозу (зменшенням кількості *TUNEL*-позитивних клітин), що поєднувалось із нормалізацією показників концентрації глюкози в крові. Все це свідчить про ефективність застосування ГТ при ЦД в цій віковій групі. У старих тварин в групі ЦД+ГТ відмічалось наростання деструктивно-дистрофічних змін ПЗ, зниження кількості ПО та їх питомого об'єму в тканині ПЗ, незначне збільшення питомого об'єму функціонально активних β-клітин (з альдегід-фуксин позитивною цитоплазмою), а також збільшення рівня апоптозу. Якщо при моделюванні ЦД морфо-функціональні зміни в ПЗ молодих і старих тварин були в основному односпрямованими (хоча ступінь їх вираженості був значно вищим у старих), то при корекції ЦД за допомогою ГТ – за рядом показників вони виявились різноспрямованими. У молодих спостерігалась певна нормалізація ознак, що вивчались, а у старих – значне їх погіршення, що призводило до наростання альтеративних змін, розвитку патологічних процесів, а також підсилення інтенсивності апоптотичної загибелі клітин. Виникнення у старих тварин за умов даної експериментальної моделі гострого інсуліту виявилось серйозним симптомом, що вказує на вікову специфіку реактивності ПЗ та на необхідність враховувати віковий фактор при розробці терапевтичної стратегії лікування ЦД.

**GENE THERAPY EFFECTS ON THE MORPHOLOGIC
PANCREATIC GLAND INDICES AT EXPERIMENTAL
DIABETES MELLITUS IN MICE OF DIFFERENT AGE****T. Yu. Kvitnitskaya-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 Kyiv

The goal of this study was to explore the age-related morphological, histochemical and morphometric specificities as well as apoptosis manifestations in the pancreatic gland (PG) in the streptozotocin-induced diabetes mellitus (DM) model and its gene therapy (GT) correction with PEI-pDNA plasmid complex carrying preproinsulin gene in the young (3–5 mos) and old (18–20 mos) mice. As a result of the GT DM correction, the young animals displayed some normalization of the structural organization of the PG, increase of the pancreatic islets (PI) quantity, being accompanied not only by their increased specific volume in the PG tissue but also by higher functional activity of the β -cells (synthetic and secretory), as well as decreased apoptosis level (decrease of the TUNEL-positive cells number), being combined with a definite normalization of the blood glucose concentration. All this is the evidence of the efficiency of GT at DM in this age group. In the DM+GT group of old animals there was an increase of the destructive-dystrophic changes in the PG, a decrease of the pancreatic islets quantity and their specific volume in the PG tissue, an insignificant increase of the specific volume of functionally active β -cells (with aldehyde-fuxin positive cytoplasm) as well as an increased apoptosis level. If the morpho-functional changes in the PG of young and old animals during DM modeling were predominantly unidirectional (although being more marked in the old mice), they appeared to be heterodirectional by many indices after GT correction of DM. The young mice showed a definite normalization of the study parameters, while the old animals showed their significant worsening, leading to the increase of alterative changes and development of pathological processes as well as to greater intensity of apoptotic cell death. The onset of acute insulinitis within a given experimental model in the old rats is a threatening symptom pointing to age-associated specifics of PG reactivity and a need of taking into consideration of the age factor in developing DM therapy strategy.

Сведения об авторах**ГУ "Институт геронтологии им. Д. Ф. Чеботарева НАМН Украины"***Лаборатория морфологии и цитологии*

Т. Ю. Квитницкая-Рыжова — зав. лабораторией, 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