

**ВЛИЯНИЕ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ  
НА МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ  
И ПОКАЗАТЕЛИ АПОПТОЗА РЯДА ОРГАНОВ  
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ**

ГУ «Институт геронтологии им. Д.Ф. Чеботарёва НАМН Украины» (г. Киев)

\*Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины (г. Киев)

pavelpklimenko@rambler.ru

Работа выполнена в рамках госбюджетной темы ГУ «Институт геронтологии имени Д.Ф. Чеботарёва НАМН Украины» «Изучение возрастных структурных, ультраструктурных и цитохимических особенностей различных органов при экспериментальном сахарном диабете и его терапии», № государственной регистрации 0114U002255.

**Вступление.** Сахарный диабет (СД) является распространенным заболеванием, сопровождающимся развитием многочисленных осложнений, что создает серьезные проблемы для здравоохранения во всем мире. В США примерно 20% населения в возрасте свыше 60 лет больны СД [3]. Следует отметить выраженную тенденцию к увеличению числа заболевших СД: к 2030 г. ожидается рост численности больных этой патологией во всём мире до 370 млн человек [6]. Одной из самых важных клинических особенностей СД является наличие хронических осложнений, затрагивающих практически все жизненно важные системы организма, что определяет необходимость исследования различных органов при этой патологии. При изучении патофизиологии СД особый интерес вызывает проблема апоптоза, поскольку появляется все больше доказательств апоптотического механизма гибели клеток различных органов при этом заболевании [1,2,5]. Оценка интенсивности апоптоза в панкреатических островках (ПО) поджелудочной железы (ПЖ), а также в клетках внутренних органов, может служить одним из критериев эффективности различных подходов при лечении СД.

В огромном массиве исследований, посвященных поиску путей коррекции СД, особое место занимают исследования в области генной терапии. В Институте молекулярной биологии и генетики НАНУ был сконструирован эукариотический вектор экспрессии гена препроинсулина человека для последующей доставки в неэндокринные клетки млекопитающих с целью разработки экспериментальной генной терапии диабета I типа [4]. Последовательность гена препроинсулина человека высокоомологична последовательности гена препроинсулина экспериментальных животных, а также обладает

высокой внутренней гомологией в связи с присутствием множественных коротких повторов [4].

**Целью** настоящей работы явилось изучение структурных, ультраструктурных, гистохимических и морфометрических особенностей, а также проявлений апоптоза, в поджелудочной железе, миокарде, печени и почке при моделировании стрептозотоцин (СТЦ)-индуцированного сахарного диабета и его коррекции с помощью генной терапии экспериментальным препаратом, PEI-pDNA комплексом, несущим ген препроинсулина.

**Объект и методы исследования.** Исследования проводили на мышах линии C57BL/6j (3-5-месячные), которые были разделены на группы: I – контрольные; II – с экспериментальным СТЦ-индуцированным СД; III – с СД и применением генной терапии с помощью плазмидного комплекса PEI-pDNA, несущего ген препроинсулина. Животных содержали в стандартных условиях вивария на стандартном рационе. Все манипуляции с ними проводили с соблюдением основных этических требований.

Для моделирования СД 1 раз в день в течение 5 суток проводили внутривенную инъекцию стрептозотоцина (Sigma, США) из расчета 40 мг/кг на 0,1 М цитратном буфере (pH 5). Развитие гипергликемии контролировали с помощью глюкометра (Accu-Chek Active, Германия). Животных декапитировали через 5 недель после развития стойкой гипергликемии.

Часть животных с СТЦ-индуцированным СД 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. Плаزمид 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 составляло 10 мкг (на

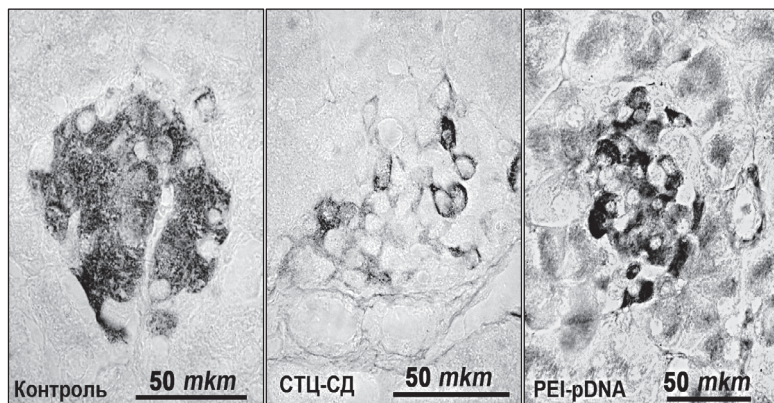
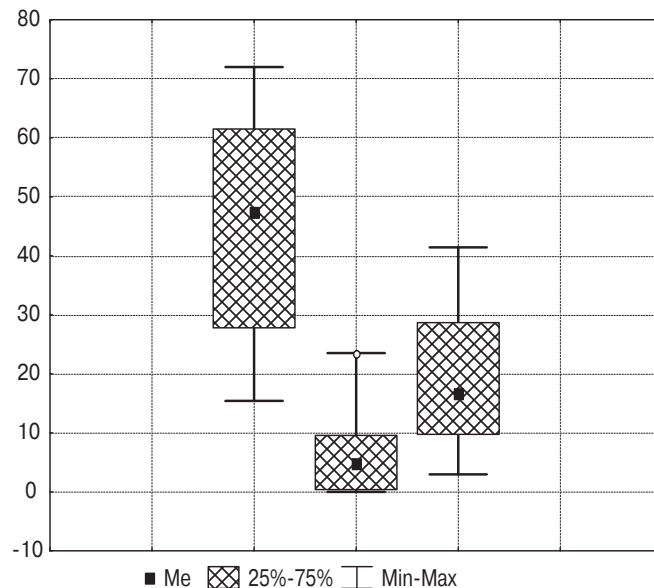
одно животное), весовое соотношение ДНК/ПЭИ составляло 1:2. На 30 сутки после введения плазмиды животных декапитировали. Поджелудочную железу, миокард левого желудочка, печень и почку изучали с помощью стандартных гистологических, а также электронно-микроскопических методов. Кроме того, гистологические срезы ПЖ окрашивали альдегид-фуксином по Гомори (для выявления секреторных гранул в  $\beta$ -клетках ПО). Апоптоз выявляли с помощью иммуногистохимического варианта TUNEL-метода с использованием коммерческих наборов (ApopTag® Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit, Chemicon, США). 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. Ультратонкие срезы просматривали под электронным микроскопом ПЭМ-125K. Во всех изученных группах экспериментальных животных вычисляли следующие показатели: количество ПО на  $1 \text{ мм}^2$  площади гистологического среза ПЖ, удельный объем эндокринной ткани в общем объеме ПЖ; удельный объем  $\beta$ -клеток в общем объеме ПО; количество дистрофически измененных инсулоцитов в ПО; количество лимфоцитов в ПО, количество TUNEL-положительных клеток во всех изученных органах. Апоптотический индекс вычислялся по стандартной формуле [1]. Статистический анализ проводили с помощью Манн-Уитни U теста.

**Результаты исследований и их обсуждение.** При моделировании СТЦ-индуцированного СД на светооптическом и электронно-микроскопическом уровнях отмечены структурные особенности внутренних органов подопытных животных (поджелудочная железа, сердце, печень, почки), которые свидетельствуют о развитии альтернативных и дистрофических изменений, как на уровне основных функциональных элементов органа, так и на уровне их соединительнотканых компонентов, а также, в значительной мере, – их микроциркуляторного русла (МЦР). Развитие нарушений кровообращения, преимущественно в МЦР, а также дистрофические изменения клеток паренхимы органов, часто приобретают черты тяжелых деструктивных повреждений, приводящих к некрозу и апоптозу клеток. При помощи TUNEL-метода при СД отмечено усиление апоптотической гибели клеток (в первую очередь, эндотелиоцитов кровеносных капилляров,  $\beta$ -клеток ПЖ, гепа-

тоцитов и эпителиоцитов проксимальных канальцев почек).

При использовании генной терапии (оперативное введение PEI-pDNA комплекса, который несет ген препроинсулина, животным с СТЦ-индуцированным СД) выявлена определенная нормализация структурной организации органов, что проявляется по-разному в различных тканях и коррелирует с нормализацией показателей концентрации глюкозы в крови у животных с СД, которым вводилась плазида.

Существенные изменения были отмечены в ПЖ, как при моделировании СД, так и при использовании генной терапии [2]. Если при СД общее количество ПО на единицу площади среза ПЖ, а также удельный объем ПО в общем объеме ткани ПЖ, существенно снижались, то при введении плазмиды эти показатели возрастали, хотя и не достигали контрольных значений (рис. 1). Это сочеталось с повышением функциональной активности (син-



Инсулоциты с А-Ф позитивной цитоплазмой в островках ПЖ

**Рис. 1.** Изменение удельного объема инсулоцитов с А-Ф позитивной цитоплазмой в общем объеме островков ПЖ мышей контрольной группы (1), при СТЦ- индуцированном СД (2) и при его коррекции с помощью PEI-pDNA комплекса (3).

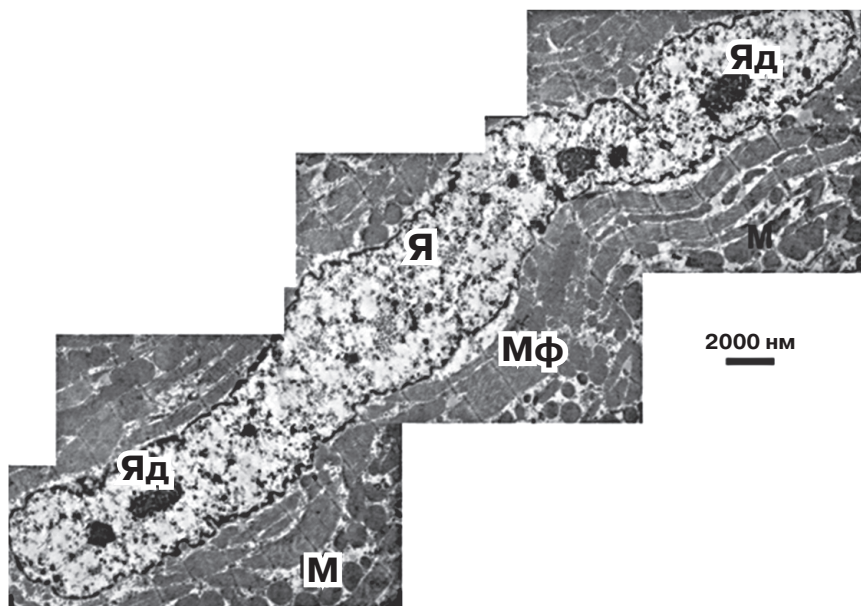
тетической и секреторной)  $\beta$ -клеток, которая также была значительно снижена при СД, что проявлялось их дегрануляцией. Удельный объем инсулоцитов с альдегидфуксин-положительной (А – F) цитоплазмой в общем объеме островков ПЖ резко снижался при моделировании СД и несколько возрастал при введении плазмиды, хотя также не достигал контрольных значений (рис. 1). При этом происходило улучшение показателей апоптоза. Количество TUNEL-положительных клеток на ПО в контроле составляло 0,08, при СД – 3,25, а при СД и генной терапии – 1,22. Нормализация структурной организации ПЖ, её основных морфометрических параметров, а также показателей апоптоза, в условиях применения генной терапии свидетельствует о ее протекторных свойствах, в определенной степени нивелирующих нарушения, возникшие при моделировании СД.

Воздействие PEI-pDNA комплекса, несущего ген препроинсулина, при экспериментальном СД, способствует не только восстановлению морфо-функциональных характеристик ПЖ, но также структуры и ультраструктуры внутренних органов (сердце, печень, почки). Уменьшается выраженность деструктивных изменений и явлений отека в миокарде и печеночной паренхиме. Воздействие плазмиды предотвращает повреждение гломерулярного фильтра почки, хотя и не устраняет повреждения канальцевого аппарата в виде зернистой дистрофии и отека цитоплазмы эпителия.

При ультраструктурном анализе миокарда левого желудочка мышей с экспериментальным СД отмечены очаговые дистрофические изменения кардиомиоцитов (КМЦ) в виде выраженного отека саркоплазмы, нарушений саркотубулярной системы и сократительного аппарата клеток (лизис миофибрилл, их дезинтеграция, распад, гомогенизация), а также повреждения ультраструктуры МЦР.

Применение генной терапии при экспериментальном СД привело к определённой нормализации ультраструктуры миокарда. Значительно уменьшились явления отека КМЦ и перикапиллярных пространств. Улучшалась структура сократительного аппарата, в большинстве клеток была хорошо выражена миофибрилярная исчерченность, с четко различимыми Z-линиями, что свидетельствует об отсутствии сократительной дисфункции, характерной для СД. В то же время существенных изменений апоптотической активности не наблюдалось ни при моделировании СД, ни при его коррекции.

Кроме того в условиях применения генной терапии в миокарде был отмечен ряд изменений, ко-

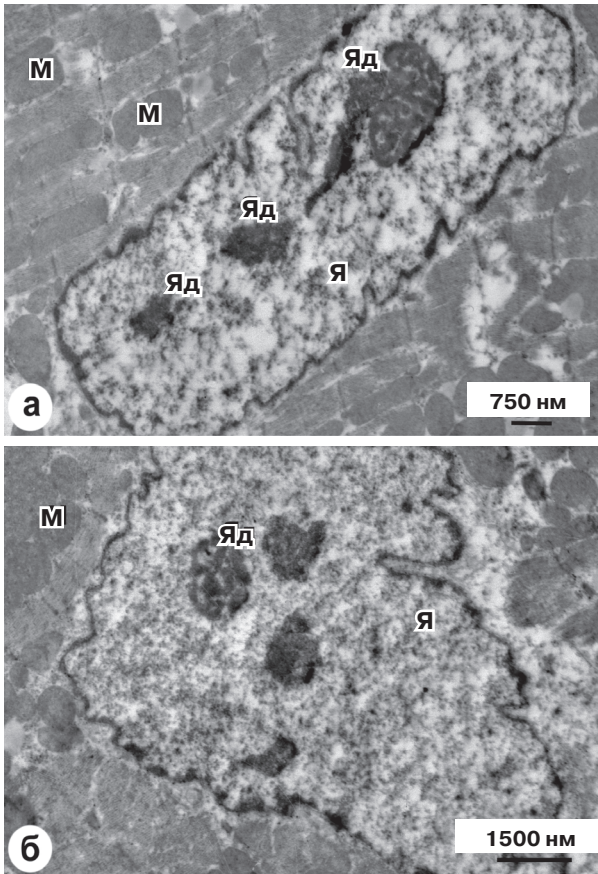


**Рис. 2. Резко выраженная гипертрофия ядра кардиомиоцита мышей при воздействии PEI-pDNA комплекса на фоне СТЦ–индуцированного СД. Электронномикроскопическое фото.**

торые носят компенсаторный характер. В первую очередь, обращает на себя внимание выраженная гипертрофия ядер КМЦ, которые в некоторых случаях в несколько раз превышали свои обычные размеры (рис. 2). Часто отмечались гипертрофия и гиперплазия ядрышек КМЦ (рис. 3). Гипертрофия ядрышек наблюдалась также в ядрах эндотелиальных клеток гемокapилляров, а также фибробластов. Кроме того, в саркоплазме некоторых КМЦ наблюдались скопления митохондрий, что, по-видимому, связано с их гиперплазией.

Гистологические изменения в печени мышей при СТЦ – индуцированном СД характеризуются нарушением кровообращения в органе, а также глубокими дистрофическими изменениями гепатоцитов вследствие нарушения циркуляции внутриклеточной жидкости (интрацеллюлярный отек, гидропическая баллонная дистрофия) и нарушения белкового обмена (гиалиновокапельная дистрофия), которые приводят или к некрозу гепатоцитов, или к их гибели путем апоптоза.

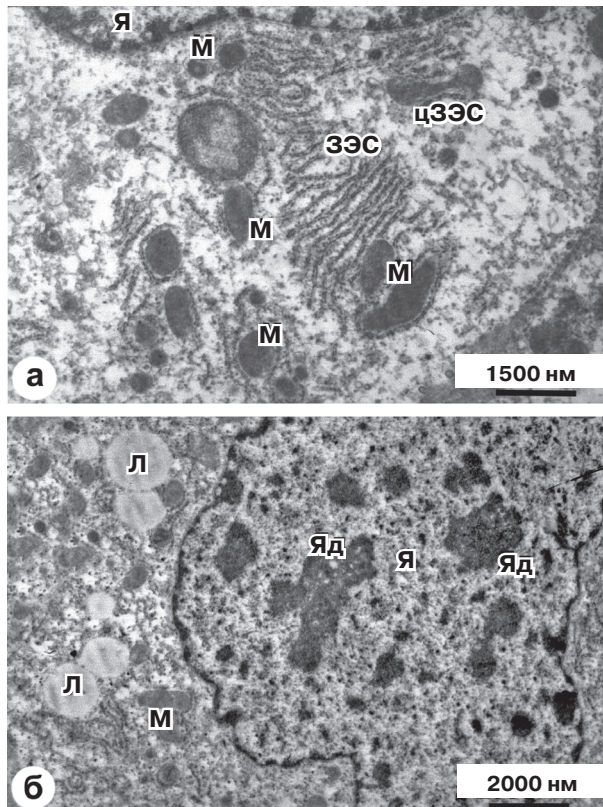
У животных, подвергавшихся воздействию PEI-pDNA комплекса, отмечена полная сохранность балочного строения печени, наблюдались незначительные дистрофические изменения гепатоцитов в виде отека и вакуолизации их цитоплазмы. При этом отмечались регенеративные изменения, направленные на поддержание тканевого гомеостаза, нарушенного воздействием СТЦ. Такие перестройки проявлялись увеличением количества двуядерных гепатоцитов, гиперплазией зернистой эндоплазматической сети (ЗЭС), а также увеличением митотической активности гепатоцитов в виде появления фигур митоза, среди которых часто встречались патологические митозы (хромосомные и хроматидные мосты при расхождении к полюсам), обусловленные, вероятно, нарушениями веретена деления.



**Рис. 3.** Ультраструктурные изменения кардиомиоцитов мышей при воздействии PEI-pDNA комплекса на фоне СТЦ-индуцированного СД:  
 а) – гипертрофия и гиперплазия ядрышек (Яд);  
 б) – гипертрофия и гиперплазия ядрышек (Яд) в ядре (Я) с извитым контуром ядерной оболочки. Электронномикроскопическое фото.

Электронно-микроскопические исследования печени мышей, подвергавшихся воздействию PEI-pDNA комплекса на фоне СТЦ-индуцированного СД, показали, что распространенность и выраженность деструктивных изменений в гепатоцитах, а также в структурах МЦР, были заметно меньшими, чем при СД. При этом в гепатоцитах обнаружены структурные признаки высокой функциональной активности, что проявлялось гипертрофией цитоплазмы, ядер и ядрышек, а также увеличением извилистости контура ядерной оболочки (**рис. 4**). Важным проявлением повышения функциональной активности клеток была гиперплазия митохондрий, причем, исключительно конденсированного типа, и «молодых» органелл, которые в цитоплазме тесно контактировали с многочисленными профилями ЗЭС.

Кроме того, положительный эффект воздействия PEI-pDNA комплекса при СТЦ – индуцированном СД на структуру печени характеризовался заметным уменьшением частоты развития моноцелюлярного некроза и апоптоза гепатоцитов. Апоптотический индекс гепатоцитов в контроле составлял 1,09 %, при СД – 23,56 %, а при СД и генной терапии – 6,1 %.



**Рис. 4.** Ультраструктурные изменения в гепатоцитах мышей при воздействии PEI-pDNA комплекса на фоне СТЦ-индуцированного СД:  
 а) – гиперплазия профилей ЗЭС, а также митохондрий (М), преимущественно, конденсированного типа;  
 б) – усложнение контура ядерной оболочки, сопровождается гипертрофией и гиперплазией ядрышек (Яд). Я – ядро; Л – липидные включения. Электронномикроскопическое фото.

Аналогичные результаты получены и для эпителия почечных канальцев. Апоптотический индекс этих клеток в контроле составлял 1,09%, при СД – 10,99%, а при СД и генной терапии – 1,96%. При этом, апоптотическая активность в клетках клубочков была слабо выражена во всех экспериментальных группах.

Таким образом, применение генной терапии (воздействие PEI-pDNA комплекса) оказывает определенное нормализующее воздействие на структуру и ультраструктуру ПЖ, миокарда, печени и почки у животных с экспериментальным СД, в определенной степени уменьшает выраженность дистрофических и других альтеративных изменений, снижает интенсивность апоптоза, а также стимулирует развитие компенсаторно-приспособительных, в первую очередь, гиперпластических процессов.

**Выводы**

1. Нормализация структурной организации ПЖ, основных морфометрических параметров ПО и морфо-функциональных особенностей β-клеток, а также показателей апоптоза (в сочетании с улучшением показателей концентрации глюко-

зы крови) в условиях применения генной терапии (воздействие PEI-pDNA комплекса, несущего ген препроинсулина) животным с экспериментальным СД свидетельствует об эффективности такого способа коррекции этой патологии.

2. Применение генной терапии оказывает определенное нормализующее воздействие на структуру и ультраструктуру миокарда, печени и почки у животных с СД, уменьшает выраженность дистрофических и деструктивных изменений, а также стимулирует развитие компенсаторно-приспособительных, гиперпластических процессов.

3. Проведенные морфологические, иммуногистохимические и морфометрические исследования показали резкое, по сравнению с контролем, увеличение интенсивности процессов апоптоза для большинства изученных клеток у мышей при СТЦ-индуцированном СД и ее заметное снижение при воздействии PEI-pDNA комплекса, что указывает на его выраженный протекторный эффект в условиях развития этой патологии.

**Перспективы дальнейших исследований** связаны с изучением возрастных аспектов этой проблемы, а также с поиском новых подходов для лечения СД.

### Литература

1. Квитницкая-Рыжова Т.Ю. Возрастные особенности проявлений апоптоза в гисто-гематических барьерах различных органов при экспериментальном сахарном диабете / Т.Ю. Квитницкая-Рыжова, А.С. Ступина, Г.В. Хаблак [и др.] // Пробл. Старения и долголетия. – 2010. – Т. 19, № 4. – С. 329-338.
2. Квитницкая-Рыжова Т.Ю. Влияние генной терапии на морфо-функциональные особенности поджелудочной железы при экспериментальном сахарном диабете / Т.Ю. Квитницкая-Рыжова, С.П. Луговской, П.П. Клименко [и др.] // Пробл. Старения и долголетия. – 2015. – Т. 24, № 3-4. – С. 7-19.
3. Коуэлл Дж. А. Сахарный диабет. Новое в лечении и профилактике; пер. с англ. / Дж. А. Коуэлл. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. – 288 с.
4. Топорова О.К. Плазмідний вектор для доставки гена препроінсуліну людини в клітини ссавців / О.К. Топорова, С.Д. Кириленко, Д.М. Іродов, В.А. Кордюм // Біополімери і клітина. – 2007. – Т. 23, № 2. – С. 100-107.
5. Lee S.C. Apoptosis in the pathophysiology of diabetes mellitus / S.C. Lee, S. Pervaiz // Int. J. Biochem. Cell Biol. – 2007. – V. 39, № 3. – P. 497-504.
6. Yamagishi S. Advanced glycation end products, oxidative stress and diabetic nephropathy / S. Yamagishi, T. Matsui // Oxid. Med. Cell. Longev. – 2010. – V. 3, № 2. – P. 101-108.

УДК 611.81-018.81:612.67:615.277.3-092.9.259

#### **ВПЛИВ ГЕННОЇ ТЕРАПІЇ НА МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ І ПОКАЗНИКИ АПОПТОЗУ РЯДА ОРГАНІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТІ**

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

**Резюме.** За умов застосування генної терапії (введення PEI-pDNA комплексу, що несе ген препроінсуліну) тваринам з СТЦ-індукованим цукровим діабетом (ЦД) виявлена певна нормалізація структурної та ультраструктурної організації підшлункової залози, серця, печінки, нирки, а також розвиток в них компенсаторно-адаптаційних процесів, що відбувається на тлі нормалізації показників концентрації глюкози в крові. За допомогою TUNEL-методу в більшості досліджених клітин відмічено зниження інтенсивності апоптозу, який суттєво підсилювався при ЦД.

**Ключові слова:** цукровий діабет, генна терапія, структура, ультраструктура, апоптоз.

УДК 611.81-018.81:612.67:615.277.3-092.9.259

#### **ВЛИЯНИЕ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ НА МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ПОКАЗАТЕЛИ АПОПТОЗА РЯДА ОРГАНОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ**

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

**Резюме.** В условиях применения генной терапии (воздействие PEI-pDNA комплекса, несущего ген препроинсулина) животным с СТЦ-индуцированным сахарным диабетом (СД) отмечена определенная нормализация структурной и ультраструктурной организации поджелудочной железы, сердца, печени, почки, а также развитие в них компенсаторно-приспособительных процессов, что происходило на фоне нормализации показателей концентрации глюкозы в крови. С помощью TUNEL-метода в большинстве изученных клеток отмечено снижение интенсивности апоптоза, который существенно усиливался при СД.

**Ключевые слова:** сахарный диабет, генная терапия, структура, ультраструктура, апоптоз.

UDC 611.81-018.81:612.67:615.277.3-092.9.259

#### **GENE THERAPY INFLUENCE ON MORPHO-FUNCTIONAL CHARACTERISTICS AND APOPTOSIS INDICES OF SEVERAL ORGANS AT EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS**

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

**Abstract.** The aim of this study was to reveal the structural, ultrastructural and histochemical features (light, electron microscopy and morphometry) as well as the manifestations of apoptosis (TUNEL-method), in the pancreatic gland (PG), heart, liver and kidney at experimental diabetes mellitus (DM) and its correction with gene therapy (GT).

The study was performed on the 3-5-month old *C57BL/6j* mice. DM modeling was performed by administering Streptozotocin (Stc) in the dose 40 mg/kg during 5 days. The animals were killed after five weeks following the development of stable hyperglycemia (DM group). Four weeks after the onset of hyperglycemia, the solution containing plasmid complex PEI-pDNA carrying gene preproinsulin was injected into animal livers (DM + GT group).

Stc impact caused circulatory disturbances developing predominantly in the microcirculatory system as well as the dystrophic and destructive changes of parenchyma cells of the internal organs that were examined. Some of them often acquired the features of irreversible destruction leading to necrosis and apoptosis of the cells. Obvious increase of the amount of TUNEL-positive cells and apoptotic bodies evidenced for STC as apoptosis inductor. The total number of pancreatic islets (PI) and their specific volume in the overall PG tissue volume were diminished that was combined with the decrease of specific volume of functionally active  $\beta$ -cells (with aldehyde-fuchsin positive cytoplasm) in the overall volume of islets.

Following injection of experimental plasmid complex PEI-pDNA carrying gene preproinsulin to the animals with Stc-induced DM (DM + GT) there were observations of definite normalization of structural and ultrastructural organization of pancreatic gland, heart, liver and kidney as well as developing of compensatory-adaptive processes in these organs. The total number of PI and their specific volume in the overall PG tissue volume were increased that was combined with increase of specific volume of the functionally active  $\beta$ -cells in the overall volume of PI, as compared with similar indices in the DM animals non-injected with plasmid. Using TUNEL-method it was shown that in the majority of the examined cells the intensity of apoptosis decreased. All these data correlated with normalization of the blood glucose concentration indices in the experimental animals injected with plasmid complex.

Gene therapy using PEI-pDNA complex carrying gene preproinsulin at experimental diabetes mellitus is thought to be perspective and needs further investigations.

**Keywords:** diabetes mellitus, gene therapy, structure, ultrastructure, apoptosis.

*Рецензент – проф. Єрошенко Г. А.*

*Стаття надійшла 06.03.2016 року*