



А.М. Камышный, И.В. Гриневич, В.А. Камышная

Особенности экспрессии проапоптотического белка p53 в селезенке крыс линии Wistar в норме и при экспериментальном сахарном диабете

Запорожский государственный медицинский университет

Ключові слова: селезінка, діабет, p53.

Ключевые слова: селезенка, диабет, p53.

Key words: spleen, diabetes, p53.

В експерименті досліджено вплив експериментального цукрового діабету на інтенсивність експресії проапоптотичного білка p53 у селезінці шурів. Для виявлення p53⁺-клітин використовували імуногістохімічний метод непрямої імунофлюоресценції з моноклональними антитілами до p53 шура. Встановлено, що розвиток експериментального цукрового діабету супроводжується збільшенням кількості p53⁺-клітин у лімфоїдних фолікулах селезінки й не впливає на їх кількість у периартеріальних лімфоїдних муфтах.

В експерименте исследовано влияние экспериментального сахарного діабета на інтенсивність експресії проапоптотического білка p53 в селезенке крыс. Для выявления и p53⁺-клеток использовали иммуногистохимический метод непрямої імунофлюоресценції с применением моноклональных антител к p53 крысы. Установлено, что развитие экспериментального сахарного діабета сопровождается увеличением количества p53⁺-клеток в лимфоидных фолликулах селезенки и не влияет на их численность в периартериальных лимфоидных муфтах.

In the experiment studied the effect of experimental diabetes mellitus on the intensity of proapoptotic protein p53 expression in the spleen of rats. To detect p53 - cells immunohistochemical technique of indirect immunofluorescence with monoclonal antibodies to p53 rats have been used. Found that the development of EDM is accompanied by increasing p53⁺ cells in lymphatic follicles of spleen and doesn't influence their number in PALS.number in PALS.

Важную роль в патогенезе сахарного діабета I типа занимают иммунологические нарушения, которые могут проявляться в разнообразных дефектах функционирования центральных и периферических органов иммуногенеза. В качестве одного из таких нарушений можно выделить дисрегуляцию герминативных центров, в которых осуществляется сложное многоуровневое взаимодействие между Т-фолликулярными хелперами Tfh, дендритными клетками и В-лимфоцитами [9]. Процесс созревания афинности антител в герминативных центрах осуществляется апоптозом и контролируется большим числом его регуляторов, от взаимодействия которых зависит уровень выживания клеток-продуцентов антител. Одним из них является проапоптотический белок p53, играющий важную роль в регуляции транскрипции и поддержании геномной стабильности. Белок p53 влияет как на внешний, так и на митохондриальный пути индукции апоптоза [3]. Действуя на последний, p53 репрессирует транскрипцию белка Bcl2 и активирует транскрипцию про-апоптотических белков Bax, Noxa, p53AIP1 и Puma [7].

Цель работы

Изучить уровень экспрессии белка p53 в селезенке крыс с экспериментальным сахарным диабетом (ЭСД), учитывая исключительную важность влияния уровня белка p53 на интенсивность апоптоза лимфоцитов.

Материалы и методы исследования

Исследования проведены на 28 самцах крыс линии Вистар массой 230–250 г (возраст 5–6 месяцев). ЭСД

моделировали однократным внутривенным введением стрептозотоцина (SIGMA, США) в дозе 50 мг/кг. Крыс с ЭСД длительностью 28 и 38 дней декапитировали под наркозом и выделяли селезенку, которую фиксировали в растворе Буэна (18 часов) и после стандартной гистологической обработки заливали в парафин. Для выявления экспрессии белка p53 в гистологических срезах селезенки использовали иммуногистохимический метод непрямої імунофлюоресценції. В качестве первичных антител использовали кроличьи моноклональные антитела (МКАТ) к p53 крысы производства Santa Cruz Biotechnology (США), с которыми гистологические срезы инкубировали в течение 18 часов во влажной камере при T=4°C. После отмывки избытка первичных антител в 0,1 М фосфатном буфере срезы инкубировали 60 минут (T=37°C) со вторичными антителами в разведении 1:64. В качестве вторичных антител использовали козьи антитела к полной молекуле IgG кролика, конъюгированные с FITC (Sigma Chemical, США). После инкубации срезы промывали 0,1 М фосфатным буфером и заключали в смесь глицерина и фосфатного буфера (9:1) для последующей люминесцентной микроскопии. Исследовали лимфоидные фолликулы и периартериальные лимфоидные муфты (ПАЛМ) селезенки, изображения которых с помощью видеокамеры СОНУ-4922 (США) вводили в систему цифрового анализа изображения VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Германия). Анализ структуры селезенки проводили с помощью оригинального программного обеспечения, разработанного на основе макроязыка программирования VIDAS.

Таблица 1

Количество p53⁺-лимфоцитов в лимфоидных фолликулах селезенки крыс линии Wistar (M±m)

Серии	p53 ⁺ -малые лимфоциты	p53 ⁺ -средние лимфоциты	p53 ⁺ -большие лимфоциты	p53 ⁺ -лимфобласты	Сумм. плотность p53 ⁺ -лимфоцитов
Интактные (контроль)	232±14 37,1±2,2%	75±7 12,0±1,1%	130±9 20,7±1,4%	191±11 30,4±1,8%	628±24
Диабет 28 дней	504±31* 46,3±2,8%*	132±13* 12,1±1,2%	213±16* 19,5±1,5%	240±18* 22,0±1,7%*	1089±51*
Диабет 38 дней	512±30* 48,5±2,8%*	125±11* 11,8±1,0%	202±16* 19,1±1,5%	217±15* 20,6±1,4%*	1057±43*

Примечание: в числителе – плотность популяции p53⁺ лимфоцитов (на 1 мм²), в знаменателе – процентная доля отдельных классов p53⁺-лимфоцитов; * – достоверность отличий параметров p<0,05 относительно контроля.

Результаты и их обсуждение

Развитие ЭСД (28 дней) сопровождалось увеличением количества p53⁺-клеток в лимфоидных фолликулах селезенки на 73% (p<0,05), по сравнению с контролем (табл. 1). Изучение распределения отдельных классов и структуры популяции p53⁺-клеток у данной группы экспериментальных животных показало достоверное увеличение плотности популяции всех p53⁺-иммунопозитивных лимфоцитов. Так, плотность популяции p53⁺-малых лимфоцитов увеличилась в 2,2 раза (p<0,05), p53⁺-средних лимфоцитов – на 76% (p<0,05), p53⁺-больших лимфоцитов – на 64% (p<0,05), p53⁺-лимфобластов – на 26% (p<0,05). При этом процентная доля p53⁺-малых лимфоцитов увеличилась на 25% (p<0,05), а процентная доля p53⁺-лимфобластов уменьшилась на 28% (p<0,05), по сравнению с контрольной группой животных (табл. 1). Развитие ЭСД сопровождалось достоверным снижением концентрации белка p53 у p53⁺-малых лимфоцитов и p53⁺-лимфобластов, по сравнению с контролем (табл. 2).

Развитие ЭСД (38 дней) сопровождалось увеличением суммарной плотности p53⁺-клеток в лимфоидных фолликулах селезенки на 68% (p<0,05), по сравнению с контрольной группой животных. При изучении распределения отдельных классов и структуры популяции p53⁺-клеток у экспериментальных животных обнаружено достоверное увеличение плотности популяции p53⁺-малых лимфоцитов (на 120%, p<0,05), p53⁺-средних лимфоцитов (на 67%, p<0,05) и p53⁺-больших лимфоцитов (на 55%, p<0,05). При этом увеличивалась процентная

доля p53⁺-малых лимфоцитов (на 31%, p<0,05) и уменьшалась процентная доля p53⁺-лимфобластов (на 32%, p<0,05), по сравнению с контрольной группой животных (табл. 1). Развитие ЭСД (38 дней) сопровождалось однонаправленной тенденцией по увеличению концентрации проапоптотического белка p53 в p53⁺-иммунопозитивных клетках, по сравнению с контролем (табл. 2).

При изучении ПАЛМ селезенки контрольных крыс установлено, что суммарная плотность p53⁺-клеток составляет 875±45 (табл. 3). При этом отмечено преобладание p53⁺-малых лимфоцитов, на долю которых приходится 36% всех p53⁺-иммунопозитивных клеток, тогда как наименее представлены p53⁺-средние лимфоциты – 12%. Развитие ЭСД (28 и 38 дней) не сопровождалось достоверным изменением количества p53⁺-клеток в ПАЛМ селезенки, по сравнению с контролем. Изучение распределения отдельных классов и структуры популяции p53⁺-клеток у данных групп экспериментальных животных показало увеличение плотности популяции и процентной доли p53⁺-малых лимфоцитов и снижение соответствующих показателей у p53⁺-лимфобластов, по сравнению с контрольной группой животных (табл. 3). При этом концентрация белка p53 изменялась разнонаправлено: у экспериментальных животных с длительностью течения ЭСД 28 дней достоверно снижалась во всех p53⁺-клетках, по сравнению с контролем, тогда как у крыс с длительностью течения ЭСД 38 дней увеличивалась у p53⁺-средних лимфоцитов и не изменялась в остальных классах (табл. 4).

Таблица 2

Концентрация белка p53⁺ (E_{иФ}) в лимфоидных фолликулах селезенки у крыс линии Wistar (M ± m)

Серии	p53 ⁺ малые лимфоциты	p53 ⁺ средние лимфоциты	p53 ⁺ большие лимфоциты	p53 ⁺ лимфобласты
Интактные (контроль)	0,408±0,004	0,433±0,007	0,448±0,005	0,504±0,006
Диабет 28 дней	0,388±0,003*	0,419±0,006	0,438±0,005	0,478±0,005*
Диабет 38 дней	0,432±0,003*	0,463±0,007*	0,488±0,006*	0,525±0,007*

Примечание: * – достоверность отличий параметров p<0,05 относительно контроля.

Таблица 3

Количество р53⁺-лимфоцитов в периартериальных лимфоидных муфтах селезенки крыс линии Wistar (M±m)

Серии	р53 ⁺ -малые лимфоциты	р53 ⁺ -средние лимфоциты	р53 ⁺ -большие лимфоциты	р53 ⁺ -лимфобласты	Суммарная плотность р53 ⁺ -лимфоцитов
Интактные (контроль)	$\frac{311 \pm 23}{35,5 \pm 2,6\%}$	$\frac{105 \pm 11}{12,1 \pm 1,2\%}$	$\frac{174 \pm 16}{20,0 \pm 1,8\%}$	$\frac{285 \pm 19}{32,6 \pm 2,2\%}$	875±45
Диабет 28 дней	$\frac{384 \pm 28^*}{51,1 \pm 3,7\%^*}$	$\frac{88 \pm 12}{11,7 \pm 1,6\%}$	$\frac{131 \pm 16}{17,4 \pm 2,1\%}$	$\frac{149 \pm 15^*}{19,8 \pm 2,1\%^*}$	751±45
Диабет 38 дней	$\frac{490 \pm 26^*}{50,8 \pm 2,7\%^*}$	$\frac{128 \pm 13}{13,3 \pm 1,3\%}$	$\frac{165 \pm 15}{17,1 \pm 1,6\%}$	$\frac{180 \pm 13^*}{18,7 \pm 1,3\%^*}$	963±40

Примечание: в числителе – плотность популяции р53⁺ лимфоцитов (на 1 мм²), в знаменателе – процентная доля отдельных классов р53⁺ лимфоцитов; * – достоверность отличий параметров р<0,05 относительно контроля.

Таблица 4

Концентрация белка р53 (Е_{ио}) в периартериальных лимфоидных муфтах селезенки крыс линии Wistar (M±m)

Серии	р53 ⁺ -малые лимфоциты	р53 ⁺ -средние лимфоциты	р53 ⁺ -большие лимфоциты	р53 ⁺ -лимфобласты
Интактные (контроль)	0,421±0,004	0,434±0,007	0,455±0,005	0,509±0,005
Диабет 28 дней	0,355±0,004*	0,370±0,007*	0,422±0,008*	0,447±0,008*
Диабет 38 дней	0,423±0,004	0,458±0,008*	0,469±0,007	0,524±0,009

Примечание: * – достоверность отличий параметров р<0,05 относительно контроля.

Белок р53 занимает особое место в регуляции апоптоза. Он способен не только активировать гены, участвующие в индукции апоптоза, но и принимает непосредственное участие в индукции митохондриального пути клеточной смерти [1]. После активации р53 он способен поступать в митохондрии из цитоплазмы, минуя входение в ядро. В митохондриях р53 подвергается быстрому ферментативному деубиквитинированию и превращению в активную форму. р53 вступает во взаимодействие с ВН4-доменом антиапоптотических белков BclXL и Bcl2 [4]. Связывание с антиапоптотическими белками высвобождает и активирует проапоптотические белки Вах и Bid. Все эти взаимодействия вызывают выброс цитохрома С и индукцию апоптоза даже без транскрипционной активации проапоптотических генов-мишеней р53. Прямая индукция апоптоза под действием р53, по-видимому, является первой и очень быстрой реакцией на массивные повреждения. Например, при облучении радиочувствительных тканей (тимус или селезенка) транслокация р53 в митохондрии и активация эффекторной каспазы 3 проявляются очень быстро (уже через 30 мин), т. е. задолго до наработки достаточного количества продуктов р53-регулируемых генов. Вторая волна индукции апоптоза отмечается только через 6–7

часов; она связана с транскрипционной активностью р53 в ядре [5]. Таким образом, действуя сразу на нескольких уровнях и путем использования совершенно разных механизмов, р53 осуществляет как быстрые реакции на сильные стрессы, так и реализует замедленную, но очень эффективную программу апоптоза поврежденных клеток. Использование ряда экспериментальных моделей (животные и линии клеток) позволило установить, что белок р53 может быть вовлечен в патогенез диабетических осложнений. Так, на мышах линии NOD показано, что гипергликемия приводит к апоптозу, опосредованному белком р53 [6], а у больных сахарным диабетом 1 типа в сыворотке крови обнаруживаются анти-р53-аутоантитела [8], увеличивается интенсивность р53-индуцированного апоптоза [2].

В целом, обнаруженные изменения экспрессии проапоптотического белка р53 в селезенке могут являться одним из факторов, поддерживающих прогрессирование аутоиммунной патологии, т. к. вызывают дисбаланс про- и антиапоптотических стимулов и могут влиять на уровень выживания спленоцитов, продуцирующих высокоаффинные антитела к собственным антигенам, в том числе и к панкреатическим.

Литература

1. Braithwaite A. The p53 story: layers of complexity / A. Braithwaite, J. Royds, P Jackson // *Carcinogenesis*. – 2005. – Vol. 26. – P. 1161–1169.
2. Diabetes increases p53-mediated apoptosis following ischemia / L. Jazayeri, M. Callaghan, R. Grogan [et al.] // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2008. – Vol. 121. – P. 1135–1143.
3. Harris S. The p53 pathway: positive and negative feedback loops / S. Harris, A. Levine // *Oncogene*. – 2005. – Vol. 24. – P. 2899–2908.
4. Hemann M. The p53-Bcl-2 connection / Hemann M., Lowe S. // *Cell Death and Differentiation*. – 2006. – Vol. 13. – P. 1256–1259.
5. In vivo mitochondrial p53 translocation triggers a rapid first wave of cell death in response to DNA damage that can precede p53 target gene activation / S. Erster, M. Mihara, R. Kim [et al.] // *Mol. Cell Biol.* – 2004. – Vol. 34. – P. 6728–6741.
6. Keim A. Hyperglycemia-induced apoptotic cell death in the mouse blastocyst is dependent on expression of p53 / A. Keim, M. Chi, K. Moley // *Mol. Reprod. Dev.* – 2001. – Vol. 60. – P. 214–224.
7. Oren M. Decision making by p53: life, death and cancer / M. Oren // *Cell Death Differ.* – 2003. – Vol. 10. – P. 431–442.
8. Serum anti-p53 autoantibodies in patients with type 1 diabetes / E. Cesare, M. Previti, F. Lombardo [et al.] // *Ann. Clin. Lab. Sci.* – 2001. – Vol. 31. – P. 253–258.
9. Vinuesa C. Dysregulation of germinal centres in autoimmune disease / C. Vinuesa, I. Sanz, C. Cook // *Nature Reviews Immunology*. – 2009. – Vol. 9. – P. 845–857.

Сведения об авторах:

Камышный А.М., д. мед. н., доцент, зав. каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии ЗГМУ.

Гриневич И.В., ассистент каф. патологической физиологии ЗГМУ.

Камышная В.А., к. мед. н., ст. преподаватель каф. анатомии человека ЗГМУ.

Адрес для переписки:

Гриневич И.В. 69035, г. Запорожье, пр-т Маяковского 26, ЗГМУ, каф. патологической физиологии ЗГМУ.

Тел.: (0612) 34 35 61, (0612) 34 27 22.

E-mail: azx_grinn@optima.com.ua