

# ВЛИЯНИЕ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ НА СТРУКТУРНЫЕ И УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РЯДА ОРГАНОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ В РАЗЛИЧНЫЕ ВОЗРАСТНЫЕ ПЕРИОДЫ

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

Государственное учреждение "Институт геронтологии им. Д. Ф. Чеботарева  
НАМН Украины", Киев

\*Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев

Одной из важнейших клинических особенностей сахарного диабета (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 апоптического механизма гибели клеток различных органов при этом заболевании. Оценка интенсивности апоптоза в панкреатических островках (ПО), а также в клетках внутренних органов может служить одним из объективных критериев эффективности различных подходов при лечении СД. Особое значение приобретает возрастной аспект этой проблемы. Ряд проявлений СД по своим морфологическим характеристикам напоминают возрастные изменения. Кроме того, предшествующие возрастные морфофункциональные изменения способствуют развитию диабетических повреждений, а различные терапевтические воздействия при СД имеют разную эффективность в разном возрасте.

**Цель работы** — изучение структурных, ультраструктурных, гистохимических и морфометрических особенностей, а также проявления апоптоза в поджелудочной железе (ПЖ), миокарде, печени, почке и мозге при моделировании стрептозотоцин(СТЦ)-индуцированного СД и его коррекции с помощью генной терапии экспериментальным препаратом PEI-pDNA-комплексом, несущим ген препроинсулина, у животных разного возраста.

**Материал и методы.** Исследования проводили на мышах линии *C57BL/6j* двух возрастных групп (молодые и старые), которые были разделены на группы: I — контрольные; II — с экспериментальным СД (1 инъекция СТЦ в дозе 40 мг/кг в течение 5 сут); III — СД + генная терапия с помощью плазмидного комплекса PEI-pDNA, несущего ген препроинсулина человека. ПЖ, миокард левого желудочка, печень, почку и кору мозга 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*).

**Результаты исследования.** При моделировании СД происходит развитие нарушений кровообращения, преимущественно микроциркуляторного русла (МЦР), а также дистрофические изменения клеток паренхимы изученных органов, которые часто приобретают черты тяжелых деструктивных повреждений, приводящих к некрозу и апоптозу клеток. При помощи *TUNEL-метода* при СД отмечено усиление апоптической гибели клеток (в первую очередь, эндотелиоцитов кровеносных капилляров,  $\beta$ -клеток ПЖ, гепатоцитов и эпителиоцитов проксимальных канальцев почек), что выражено у старых животных значительно сильнее, чем у молодых. Применение генной терапии у молодых животных с СД оказывает определенное нормализующее воздействие на структуру и ультраструктуру ПЖ, миокарда, печени и почки у животных с СД, уменьшая выраженность дистрофических и деструктивных изменений, а также стимулируя развитие компенсаторно-приспособительных, гиперпластических процессов на клеточном и субклеточном уровне. Кроме того, в большинстве изученных клеток происходит заметное снижение интенсивности апоптоза, что указывает на выраженный протекторный эффект PEI-pDNA-комплекса в условиях развития этой патологии у молодых животных. Применение генной терапии у старых животных с СД не оказывало выраженного нормализующего эффекта на структуру и ультраструктуру изученных органов. Наблюдались глубокие альтернативные изменения их клеточных компонентов и МЦР. В некоторых случаях происходило развитие патологических процессов (инсулит в ПЖ). При этом показатели апоптоза (резко возросшие при СД, гораздо сильнее, чем у молодых) уменьшались незначительно (гепатоциты, кардиомиоциты), практически не изменялись (эпителиоциты проксимальных канальцев почек) или даже возрастали (инсулоциты ПО).

**Вывод.** Нормализация структурной и ультраструктурной организации внутренних органов, основных морфометрических параметров ПО и морфо-функциональных особенностей  $\beta$ -клеток, а также показателей апоптоза (в сочетании с улучшением показателей концентрации глюкозы крови) в

условиях применения генной терапии (воздействие PEI-pDNA комплекса, несущего ген препроинсулина) у молодых животных с экспериментальным СД свидетельствует об эффективности такого способа коррекции этой патологии. У старых животных происходило усиление деструктивно-дистрофических процессов, как при моделировании СД, так и при его коррекции с помощью генной терапии, что приводило к драматическому усилению клеточной гибели.

## ВОЗРАСТНЫЕ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ И ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

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

Государственное учреждение "Институт геронтологии им. Д. Ф. Чеботарева НАМН Украины", Киев

\*Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев

В патогенезе сахарного диабета (СД), одного из наиболее распространенных возраст-зависимых заболеваний, ведущую роль играет повреждение панкреатических островков (ПО) в результате аутоиммунного процесса, что приводит к недостаточности синтеза инсулина. При моделировании СД у экспериментальных животных широко применяется введение стрептозотоцина (СТЦ), оказывающего токсическое воздействие на  $\beta$ -клетки поджелудочной железы (ПЖ), что может быть полезным как для изучения механизмов развития заболевания, в том числе и в различные возрастные периоды, так и для поиска новых подходов для его коррекции.

**Цель работы** — изучение возрастных морфологических, гистохимических и морфометрических особенностей ПЖ, а также проявлений апоптоза 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 сут делали внутрибрюшинную инъекцию СТЦ ("Sigma", США) из расчета 40 мг/кг на 0,1 М цитратном буфере (рН 5). Животных выводили из эксперимента через 5 нед после развития стойкой гипергликемии. В качестве контроля использовали интактных животных того же возраста, которым внутрибрюшинно вводили цитратный буфер. Часть животных с СТЦ-индуцированным СД подвергалась генной терапии плазмидным комплексом PEI-pDNA, содержащим ген препроинсулина. Через 4 нед 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. ПЖ изучали с помощью стандартных гистологических методов. Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином, а также альдегид-фуксином по Гомори (для выявления секреторных гранул в  $\beta$ -клетках ПО) и изучали с использованием системы анализа изображений на основе микроскопа Olympus BX51 с программным обеспечением Olympus DP-Soft 3.2. Апоптоз выявляли с помощью иммуногистохимического варианта TUNEL-метода с использованием коммерческих наборов (ApopTag® Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit, Chemicon, США). Морфометрия: во всех изученных группах экспериментальных животных (контроль, СД, СД + PEI-pDNA) вычисляли следующие показатели: количество ПО на 1 мм<sup>2</sup> 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; апоптотический индекс. Статистический анализ проводили с помощью Манна–Уитни U теста.

**Результаты исследования.** При моделировании СТЦ-индуцированного СД у молодых и старых мышей с помощью светооптических, гистохимических и морфометрических исследований отмечен комплекс альтеративных изменений ПО, свидетельствующих о развитии дистрофических процессов и снижении функциональной (синтетической и секреторной) активности  $\beta$ -клеток, а также об усилении интенсивности апоптоза, что было особенно демонстративным у старых животных.

При введении молодым животным с СД PEI-pDNA-комплекса, несущего ген препроинсулина, отмечена определенная нормализация структурной организации ПЖ и снижение интенсивности апоптоза (уменьшение количества TUNEL-положительных клеток). Происходит увеличение общего