

УДК 611.81-018.81:612.67:615.277.3-092.9.259
doi: 10.22494/cot.v6i1.81

Влияние генной терапии PEI-pDNA комплексом, несущим ген препроинсулина человека, на структурные и ультраструктурные характеристики ряда органов при экспериментальном сахарном диабете у мышей разного возраста



Квитницкая-Рыжова Т. Ю.¹, Луговской С. П.¹, Клименко П. П.¹, Михальский С. А.¹, Хаблак Г. В.¹, Топорова Е. К.²

¹ГУ «Институт геронтологии имени Д. Ф. Чеботарева Национальной академии медицинских наук Украины», Киев, Украина

²Институт молекулярной биологии и генетики Национальной академии наук Украины, Киев, Украина

e-mail: morphology@geront.kiev.ua

РЕЗЮМЕ

Сахарный диабет (СД) является одним из ведущих возраст-зависимых заболеваний. Его распространенность, по прогнозам ВООЗ, будет неуклонно увеличиваться, поэтому изучение возрастных особенностей его развития и поиск новых подходов к его лечению, с учетом возрастного фактора, остается одной из актуальных задач современной медико-биологической науки.

ЦЕЛЮ работы явилось изучение возрастных особенностей влияния генной терапии PEI-pDNA комплексом, несущим ген препроинсулина человека, на морфофункциональные характеристики внутренних органов, в наибольшей степени подверженных диабетической дисфункции, при стрептозотоцин-индуцированном СД у мышей разного возраста.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. СД моделировали у 3- и 20-месячных мышей с помощью введения стрептозотоцина (40 мг/кг на 0,1 М цитратном буфере, 1 раз в сутки, в течение 5 суток). Через 4 недели после развития устойчивой гипергликемии в печень вводили плазмидный комплекс PEI-pDNA, несущий ген препроинсулина человека. На 30 сутки после введения плазмиды с помощью гистологических, электронномикроскопических, гистохимических и иммуногистохимических методов изучали морфофункциональные особенности поджелудочной железы, миокарда, печени и почек молодых и старых мышей.

РЕЗУЛЬТАТЫ. У молодых животных применение комплекса PEI-pDNA с геном препроинсулина человека оказало нормализующее воздействие на структуру и ультраструктуру изученных органов, способствовало уменьшению выраженности дистрофических и деструктивных изменений в клетках их паренхимы и микроциркуляторного русла, снижению интенсивности апоптоза, а также стимуляции развития компенсаторно-приспособительных гиперпластических процессов. У старых – наблюдался незначительный положительный эффект терапии или его отсутствие. Нередко происходило ухудшение некоторых параметров структурной и ультраструктурной организации ряда органов, сохранение высокой интенсивности апоптоза и развитие осложнений в виде инсулита.

ВЫВОДЫ. Влияние комплекса PEI-pDNA, содержащего ген препроинсулина человека, на морфофункциональные характеристики внутренних органов при СД у мышей имеет различную эффективность в разном возрасте: высокую у молодых и незначительный эффект, его отсутствие, или дополнительное ухудшение – у старых, что проявлялось в различной степени в разных тканях. При разработке стратегии лечения СД, в частности при использовании генной терапии, необходимо учитывать возрастной фактор.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: сахарный диабет; генная терапия; препроинсулин; апоптоз; старение

Сахарный диабет (СД) является одним из наиболее распространенных многофакторных возраст-зависимых эндокринных заболеваний, сопровождающихся многочисленными осложнениями. Эпидемиологи ВОЗ ранее прогнозировали, что к 2025 г. количество больных СД превысит 400 млн., из которых 80-90 % составят больные СД 2 типа. К 2010 г. количество заболевших в возрасте 20-79 лет должно было составить 6,4 %, охватывая 285 млн., а к 2030 г. – должно было увеличиться до 7,7 %, охватывая 439 млн. [1]. Но на сегодняшний день эксперты прогнозируют, что к 2030 г. количество больных СД в мире составит уже даже не 336 млн. и не 440 млн., как предполагалось, а 552 млн., приобретая масштабы «неинфекционной» эпидемии XXI века [2, 3]. Согласно данным Всемирной федерации и сахарного диабета (IDF), по состоянию на 2015 г. на планете насчитывалось 415 млн. больных, а по прогнозам на 2040 г. количество людей с СД увеличится до 642 млн. [3].

В последнее время во всем мире, и в Украине в частности, наблюдается увеличение количества людей старше 60 лет, то есть происходит очевидное постарение населения. Именно для данной возрастной категории особенно характерна значительная распространенность СД, что делает эту патологию одним из основных объектов геронтологических исследований [4, 5].

Наличие серьезных осложнений при СД, охватывающих практически все системы организма, значительно повышает риск развития микро- и макроциркуляторных заболеваний и уровень смертности в первую очередь от сердечно-сосудистой патологии [6-10]. Особый интерес вызывают тонкие изменения эндотелия в связи с особой ролью эндотелиальной дисфункции в патогенезе СД [8, 11-13]. Также большое значение при исследовании патофизиологии СД уделяют механизмам клеточной гибели, связанным с патогенезом этого заболевания и развитием его осложнений [11, 14]. Все это определяет необходимость исследования морфофункциональных изменений клеточных, неклеточных компонентов и микроциркуляторного русла (МЦР) внутренних органов, в наибольшей степени подверженных диабетической дисфункции, при моделировании СД и его коррекции, с учетом особенностей этих процессов в различные возрастные периоды.

В большом массиве работ, посвященных поиску вариантов лечения СД, встречаются исследования в области генной терапии. Коллективом сотрудников Института молекулярной биологии и генетики Национальной академии наук 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 [15]. Последовательность гена препроинсулина человека высокоомологична последовательности гена препроинсулина экспериментальных животных, а также обладает высокой внутренней гомологией в связи с присутствием множественных коротких повторов [15].

Цель работы – установить структурные, ультраструктурные, гистохимические и морфометрические особенности, а также интенсивность апоптоза в поджелудочной железе, миокарде, печени и почке при моделировании стрептозотоцин-индуцированного СД и его коррекции с помощью генной терапии экспериментальным препаратом PEI-rDNA комплексом, несущим ген препроинсулина человека, у животных разного возраста.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены с учетом существующих норм биотики Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и научных целей (European Convention, Strasburg, 1986), а также статьи 26 Закона Украины «О защите животных от жестокого обращения» (№ 3447-IV, от 21.02.2006 г.).

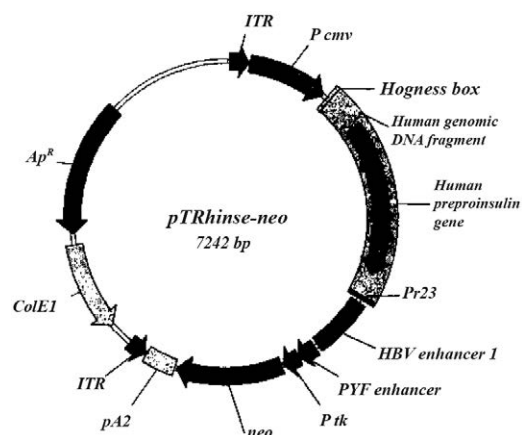


Рис. 1. Схема использованной плазмиды, содержащей ген препроинсулина человека [15].

Исследования проводили на мышах линии *C57BL/6j* двух возрастных групп (молодые 3-месячные и старые 18-20-месячные), которые были разделены на группы: I – контрольные; II – с экспериментальным СД; III – диабет + генная терапия (СД+ГТ) с использованием плазмидного комплекса PEI-rDNA, содержащего ген препроинсулина человека. Сахарный диабет моделировали путем внутрибрюшинного введения стрептозотоцина (*Sigma*, США) в дозе 40 мг/кг на 0,2 мл 0,1 М цитратного буфера (pH 5) в течение 5 суток. В качестве контроля использовали интактных животных того же возраста, которым внутрибрюшинно вводили 0,2 мл цитратного буфера.

Развитие гипергликемии контролировали с помощью глюкометра (*Accu-Chek Active*, Германия). Забор крови производили натошак с помощью микрокапилляров из ретроорбитального венозного синуса. Животных выводили из эксперимента через 5 недель после развития стойкой гипергликемии. Дальнейшее пребывание в эксперименте было невозможно из-за плохого соматического состояния и высокой летальности старых животных. Полученный от них материал позволил оценить весь комплекс реактивных изменений изученных органов на пике патологического процесса без теоретически возможного самоизлечения или применения экспериментальной коррекции заболевания.

У части животных со стрептозотоцин-индуцированным СД обеих возрастных групп была применена генная терапия. Через 4 недели после развития устойчивой гипергликемии в их печень вводили раствор, содержащий плазмидный вектор для доставки гена препроинсулина человека, который был получен в отделе регуляторных механизмов клетки Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины [15]. Плазида (рис. 1) со встроенным геном препроинсулина человека, преципитированная полиэтиленимином (PEI), 25кД, готовилась *ex tempore* за 10 мин до введения. Объем преципитированной rDNA – 90 мкл, содержание плазмидной rDNA в препарате составляло 10 мкг на одно животное, весовое соотношение rDNA/PEI составляло 1:2. Процедура введения препарата подробно описана в нашей предыдущей статье [16].

На 30-е сутки после введения плазмиды животных выводили из эксперимента. Использовано 12 контрольных мышей (7 молодых и 5 старых), 16 – со стрептозотоцин-индуцированным СД (10 молодых и 6 старых) и 12 – с индуцированным СД, получавших плазмиду с геном препроинсулина человека (6 молодых и 6 старых).

Ткань поджелудочной железы, миокарда левого желудочка, печени и почки изучали с помощью стандартных гистологических, а также электронномикроскопических методов. Поджелудочную железу фиксировали в фиксаторе Буэна, гистологические срезы толщиной 5 мкм, полученные на ротационном микротоме HM 325 (*Microm*, США), окрашивали гематоксилином и эозином, как и срезы

всех других органов. Также препараты поджелудочной железы окрашивали альдегид-фуксином по Гомори для выявления секреторных гранул в β -клетках панкреатических островков. 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 BX51 с программным обеспечением DP-Soft 3.2 (*Olympus*, Япония). Во всех изученных группах экспериментальных животных (контроль, СД, СД+ГТ в двух возрастных группах) вычисляли следующие морфометрические показатели: количество панкреатических островков на 1 мм^2 площади среза поджелудочной железы, удельный объем эндокринной ткани в общем объеме поджелудочной железы; удельный объем β -клеток в общем объеме панкреатических островков; количество дистрофически измененных инсулоцитов и количество лимфоцитов в панкреатических островках. Ультратонкие срезы миокарда, печени и почки, изготовленные с помощью ультратома LKB-III (*Bromma*, Швеция), анализировали под электронным микроскопом ПЭМ-125K (*SELMi*, Украина).

Апоптоз выявляли с помощью иммуногистохимического варианта TUNEL-метода с использованием коммерческих наборов AporTag® Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (*Chemicon*, США), что подробно описано в нашей предыдущей статье [16]. Вычисляли индекс апоптоза (АИ) – количество TUNEL-положительных клеток на 1 мм^2 площади среза.

Статистический анализ проводили методами параметрической и непараметрической статистики с использованием модулей Excel (*Microsoft*, США) и программного продукта Statistica 6.0 (*Stat Soft Inc.* США), а проверку статистических гипотез – с помощью критерия У Вилкоксона-Манна-Уитни; различия значимы при $\alpha = 0,05$, в таблице использовалась медиана (*Me*), значения интерквартильных интервалов (Q_{25} - Q_{75}), а также минимальное и максимальное значения (*min-max*).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При моделировании СД у животных обеих возрастных групп отмечено развитие нарушений кровообращения, преимущественно микроциркуляторного русла, а также дистрофические и альтернативные изменения клеток паренхимы изученных органов, которые часто

приобретали черты тяжелых деструктивных повреждений, приводящих к их некрозу и апоптозу. При помощи TUNEL-метода при стрептозотацин-индуцированном СД выявлено усиление апоптотической гибели клеток (в большей степени – эндотелиоцитов кровеносных капилляров различных органов, β -клеток поджелудочной железы, гепатоцитов и эпителиоцитов проксимальных канальцев почек). У старых животных эти изменения были выражены значительно сильнее, чем у молодых, зачастую приобретая необратимый характер. Во всех изученных органах средние значения индекса апоптоза при моделировании СД были также значительно выше у старых (табл. 1). Особенно демонстративными эти различия оказались в панкреатических островках (медиана индекса апоптоза у молодых составил 9,83 TUNEL+ клеток/ мм^2 а у старых – 20,27 TUNEL+ клеток/ мм^2) и в еще большей степени – в миокарде (0,14 TUNEL+ клеток/ мм^2 – у молодых и 26,49 TUNEL+ клеток/ мм^2 – у старых).

Применение генной терапии у молодых животных со стрептозотацин-индуцированным СД оказывает определенное нормализующее воздействие на структуру и ультраструктуру поджелудочной железы, миокарда, печени и почек, 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 происходило 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 со стрептозотацин-индуцированным СД не оказывало выраженного нормализующего эффекта на структуру и ультраструктуру изученных органов. Наблюдались глубокие альтернативные изменения их клеточных компонентов и микроциркуляторного русла. В некоторых случаях происходило развитие патологических процессов (инсулит в поджелудочной железе). При этом показатели апоптоза, резко возросшие при СД у старых животных, гораздо сильнее, чем у молодых, уменьшались незначительно (гепатоциты, кардиомиоциты), практически не изменялись (эпителиоциты проксимальных канальцев почек), или даже возрастали (инсулоциты панкреатических островков).

Анализ морфофункциональных изменений внутренних органов при моделировании СД и поиске путей его коррекции невозможен

Таблица 1. Индекс апоптоза в различных органах молодых и старых мышей групп СД и СД+ГТ по сравнению с контролем (количество TUNEL+ клеток в 1 мм^2).

ГРУППЫ	МОЛОДЫЕ МЫШИ			СТАРЫЕ МЫШИ			
	min-max	Me	Q_{25} - Q_{75}	min-max	Me	Q_{25} - Q_{75}	
Поджелудочная железа	Контроль	0.00-0.02	0.01	0.005-0.01	2.0-24.52	3.75	3.25-8.37
	СД	3.12-17.67	9.83*	6.19-14.03	6.11-39.11	20.27*#	12.60-30.27
	СД+ГТ	0.20-2.37	0.63*	0.25-1.66	18.81-31.24	27.06*#	24.92-30.77
Печень	Контроль	0.32-1.87	0.86	0.47-1.48	0.55-5.93	2.46	1.82-4.02
	СД	3.16-13.96	11.62*	6.42-13.76	7.81-14.60	10.15*	8.14-13.21
	СД+ГТ	0.94-9.92	6.10*#	4.12-9.44	2.25-12.67	8.96*#†	4.42-12.00
Миокард	Контроль	0.00-0.07	0.03	0.02-0.06	6.32-28.43	10.18#	7.88-13.12
	СД	0.12-0.18	0.14*	0.13-0.16	18.80-41.99	26.49*#	22.63-31.30
	СД+ГТ	0.04-0.16	0.08*	0.04-0.10	8.02-24.72	14.15*#	11.30-18.93
Почка	Контроль	0.09-3.09	2.10	1.31-2.73	1.41-7.54	4.07#	3.40-5.73
	СД	4.31-10.92	7.95*	7.86-8.99	7.48-14.44	9.37*#	8.95-13.28
	СД+ГТ	4.34-9.21	5.72*	5.41-6.56	6.45-12.04	7.58*#	6.93-9.45

Примечания: различия значимы при $\alpha = 0,05$, * – по сравнению с контролем; # – по сравнению с группой молодых мышей; † – по сравнению с группой СД.

без учета концентрации глюкозы в сыворотке крови у животных всех экспериментальных групп, что и было проведено нами ранее [17]. Полученные результаты морфологических исследований хорошо сочетались с этими биохимическими показателями. Согласно полученным нами данным, при стрептозотоцин-индуцированном СД в обеих возрастных группах уровень глюкозы 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 [17].

Эти основные положения могут быть проиллюстрированы на примере органов, которые считаются наиболее уязвимыми при СД. Однако пусковым механизмом всех изучаемых явлений, связанных с возможным развитием диабетических осложнений, являются морфофункциональные изменения поджелудочной железы. При моделировании стрептозотоцин-индуцированного СД, в большей степени соответствующего СД I типа, принципиально важной становится оценка морфофункциональных изменений поджелудочной железы в условиях эксперимента. Следовательно, в контексте цели настоящей работы необходимо привести данные наших предыдущих исследований [17].

Структурные изменения в поджелудочной железе. При исследовании поджелудочной железы нами было отмечено, что морфометрические показатели (количество панкреатических островков на единицу площади и удельный объем панкреатических островков в общем объеме ткани поджелудочной железы) у старых животных оказались значительно ниже, чем у молодых, а уровень апоптоза – существенно выше вследствие возрастных изменений этой железы. При этом показатель функциональной активности панкреатических островков (содержание инсулоцитов с A-F-положительными секреторными гранулами в цитоплазме) мало отличался у молодых и старых контрольных животных, хотя его разброс оказался значительно большим у последних, что отражает гетерогенность морфологических признаков, характерную для процессов старения (рис. 2).

При моделировании СД количественные параметры панкреатических островков снижались в обеих возрастных группах, а уровень функциональной активности инсулоцитов падал особенно резко

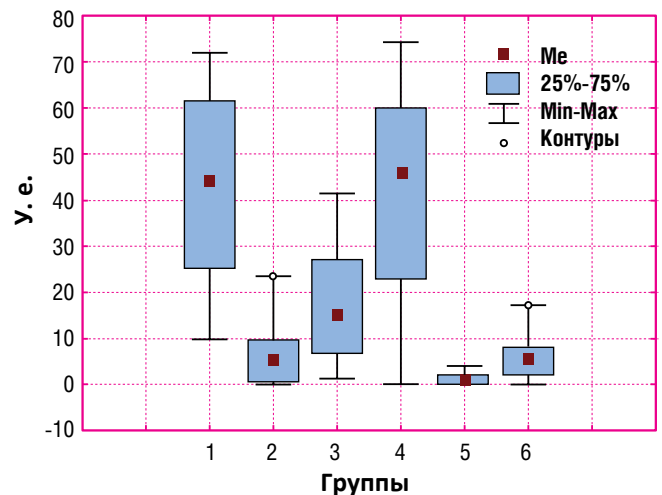


Рис. 2. Диаграммы изменения удельного объема инсулоцитов с A-F-положительными секреторными цитоплазматическими гранулами в поджелудочной железе молодых (1, 2, 3) и старых (4, 5, 6) мышей в группах СД (2, 5) и СД+ГТ (3, 6) по сравнению с контролем (1, 4).

у старых, отражая более глубокие деструктивно-дистрофические и атрофические процессы, развивающиеся в панкреатических островках при СД в старости. Уровень апоптоза существенно возрастал, особенно у старых, что сочеталось со значительно более глубокими структурными повреждениями поджелудочной железы, отмеченными нами в этой возрастной группе.

При введении плазмидного комплекса молодым животным со стрептозотоцин-индуцированным СД содержание инсулоцитов с A-F-положительными гранулами в цитоплазме возрастало (рис. 2). Уровень апоптоза, определяемый с помощью TUNEL-метода, оказался существенно ниже, чем у животных, не получавших соответствующего лечения, что явилось объективным критерием эффективности геновой терапии в этом возрасте. Иная закономерность была выявлена у старых. Количество функционально активных инсулоцитов

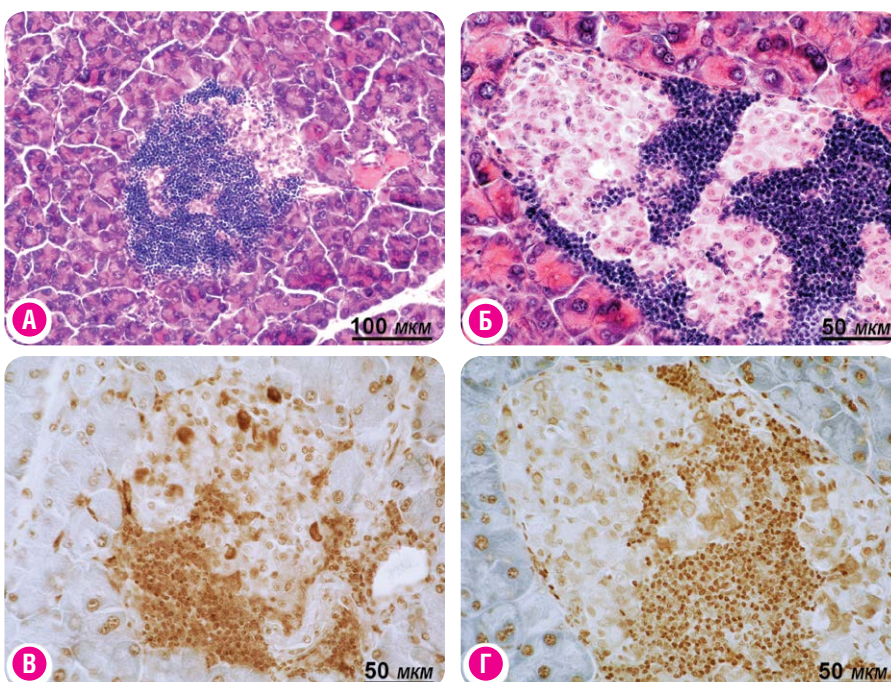


Рис. 3. Микрофотографии препаратов поджелудочной железы старых мышей в группе СД+ГТ. Структурные изменения панкреатических островков: А, Б – резко выраженная инфильтрация островков лимфоцитами с развитием инсулита, окраска гематоксилин-эозином; В, Г – апоптоз инсулоцитов и лимфоцитов, обильно инфильтрирующие островки, TUNEL метод.

увеличивалось незначительно (рис. 2). Если у молодых животных со стрептозотонин-индуцированным СД введение плазмидного комплекса приводило к существенному снижению индекса апоптоза, приближавшегося к контрольным величинам (Ме АИ 9,83 TUNEL⁺ клеток/мм² – при СД; 0,63 TUNEL⁺ клеток/мм² – при СД+ГТ), то у старых – не только не происходило никакого снижения этого показателя, но был даже отмечен его рост – 20,27 TUNEL⁺ клеток/мм² при СД и 27,06 TUNEL⁺ клеток/мм² при СД+ГТ (табл. 1, см. с. 40). Кроме того, апоптозу подвергались не только инсулоциты панкреатических островков, но и эпителиоциты протоков, эндотелиоциты кровеносных капилляров, экзокриноциты, а также лимфоциты, заполняющие островки (рис. 3, см. с. 41).

Итак, если при моделировании СД морфофункциональные изменения в поджелудочной железе 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.

Воздействие PEI-pDNA комплекса, несущего ген препроинсулина, при экспериментальном СД способствовало не только восстановлению морфофункциональных характеристик поджелудочной железы молодых животных, но также структуры и ультраструктуры внутренних органов (сердце, печень, почки). Уменьшалась выраженность деструктивных изменений и явлений отека в миокарде и печеночной паренхиме. Воздействие плазмиды предотвращало повреждение гломерулярного фильтра почки, хотя и не устраняло повреждения канальцевого аппарата в виде зернистой дистрофии и отека цитоплазмы эпителия. У старых животных в аналогичных условиях эксперимента во всех изученных органах происходили различные изменения, свидетельствующие о выраженном возраст-зависимом эффекте генной терапии.

Гистологическое исследование миокарда. При гистологическом изучении миокарда левого желудочка мышей с экспериментальным СД обеих возрастных групп отмечено нарушение кровообращения (полнокровие артерий мелкого и среднего калибра; развитие очагов периваскулярного отека с последующим распространением на соединительнотканную строму органа, которая одновременно

инфильтрируется лейкоцитами, лимфоцитами и макрофагами; очаговый отек, плазматическое пропитывание и гиалиноз стенки артерий; агрегация и адгезия к поверхности сосудистого эндотелия эритроцитов и тромбоцитов, что свидетельствует о нарушении реологических свойств крови) и дистрофические изменения кардиомиоцитов, а также развитием их контрактурных повреждений и очагового фиброза. У старых животных с СД дистрофические и деструктивные процессы в миокарде были выражены значительно сильнее, чем у молодых.

При воздействии PEI-pDNA комплекса на фоне определенной нормализации структуры миокарда левого желудочка сохранялись очаги периваскулярного отека и фиброза; микроциркуляторные нарушения в интрамуральных сосудах, очаги перичеллюлярного отека кардиомиоцитов, а также их очаговая дистрофия в виде отека, набухания и миоцитолита, волнообразной деформации и гиперрелаксации саркомеров (рис. 4 А, Б). Такой вид дистрофии кардиомиоцитов является следствием преимущественно их ишемического повреждения. У старых животных группы СД+ГТ эти процессы носили более выраженный характер. Отмечалось нарастание дистрофических изменений в кардиомиоцитах и микроциркуляторном русле, а также усиление лимфоцитарной инфильтрации межочечной ткани.

При ультраструктурном анализе миокарда левого желудочка мышей со стрептозотонин-индуцированным СД отмечены очаговые дистрофические изменения кардиомиоцитов в виде выраженного отека саркоплазмы, нарушений саркотубулярной системы и глубоких повреждений сократительного аппарата клеток (лизис миофибрилл, их дезинтеграция, распад, гомогенизация), а также ультраструктуры микроциркуляторного русла (некротические или апоптотические изменения эндотелиоцитов, расширение перикапиллярного пространства, увеличение количества волокнистых структур в перикапиллярной зоне) (рис. 4 В).

Применение генной терапии при СД у молодых животных привело к определенной нормализации ультраструктуры миокарда (рис. 4 Г). Значительно уменьшились явления отека кардиомиоцитов и перикапиллярных пространств. Улучшалась структура сократительного аппарата, в большинстве клеток была хорошо выражена миофибриллярная исчерченность, с четко различимыми Z-линиями, что свидетельствует об уменьшении сократительной дисфункции, характерной для СД. В то же время существенных изменений апоптотической активности не наблюдалось ни при моделировании СД, ни при

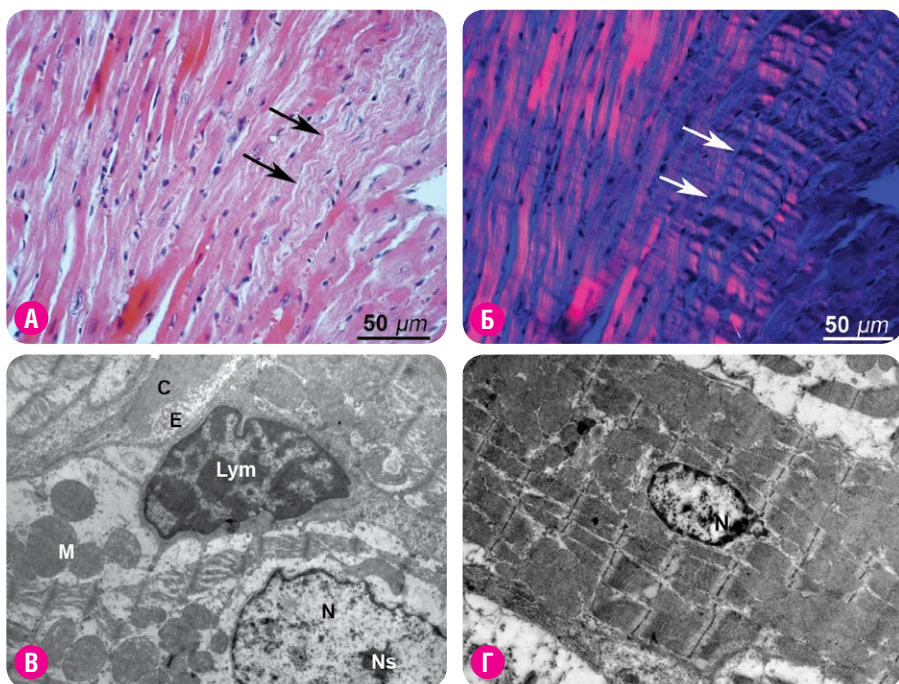


Рис. 4. Микрофотографии препаратов миокарда молодых мышей групп СД (В) и СД+ГТ (А, Б, Г). Гистологические (А, Б) и ультраструктурные (В, Г) изменения: А, Б – стрелками указана волнообразная деформация кардиомиоцитов и гиперрелаксация саркомеров; В – кардиомиоциты с выраженным отеком саркоплазмы и деструкцией миофибрилл, эндотелиоцит капилляра в стадии некроза; Г – нормализация ультраструктуры кардиомиоцитов, умеренный субсарколеммальный отек в соседних клетках. Световая (А), поляризационная (Б) и электронная (В, Г) микроскопия.

Примечания: Лум – лимфоцит, М – митохондрия, С – просвет капилляра, Е – эндотелиоцит, N – ядро, Ns – ядрышко.

его коррекции. Кроме того, в условиях применения генной терапии в миокарде молодых животных был отмечен ряд изменений, которые носили компенсаторный характер – выраженная гипертрофия ядер кардиомиоцитов (в некоторых случаях они в несколько раз превышали свои обычные размеры), гипертрофия и гиперплазия ядрышек, гиперплазия митохондрий. Гипертрофия ядрышек наблюдалась также и в ядрах эндотелиальных клеток гемокapилляров, а также фибробластов.

У старых животных группы СД+ГТ, на фоне некоторого улучшения ультраструктуры миокарда, сохранялись дистрофические изменения клеток и микроциркуляторного русла в виде лизиса миофибрилл и субсарколеммального отека, усиления лимфоцитарной инфильтрации межтканочной ткани, а также отека соединительнотканной стромы, повреждения эндотелиальных клеток кровеносных капилляров, в то время как компенсаторно-адаптационные процессы были выражены крайне слабо.

В то же время значительные возрастные различия были отмечены при изучении апоптоза в миокарде. Если у молодых животных не наблюдалось изменений апоптотической активности ни при моделировании СД, ни при его коррекции с помощью генной терапии, то у старых – происходило резкое усиление процесса апоптоза кардиомиоцитов. Если у молодых животных Me AI были 0,03 TUNEL⁺ клеток/мм² – в контроле, 0,14 TUNEL⁺ клеток/мм² – при СД и 0,08 TUNEL⁺ клеток/мм² – при СД+ГТ, то у старых – эти показатели увеличивались в разы до 10,18 TUNEL⁺ клеток/мм² в контроле, 26,49 TUNEL⁺ клеток/мм² – при СД, 14,15 TUNEL⁺ клеток/мм² – в группе СД+ГТ (табл. 1, см. с. 40). Следовательно, при моделировании СД у старых животных этот показатель увеличивался почти в три раза по сравнению с контролем, а в группе СД+ГТ снижался почти в два раза. Несмотря на серьезные структурные и ультраструктурные повреждения миокарда старых животных, отмеченные на фоне генной терапии, апоптотическая гибель клеток уменьшалась.

Дистрофические изменения кардиомиоцитов, их апоптоз, а также миокардиальный фиброз и повреждения микроциркуляторного русла при СД считаются ключевыми патогенетическими факторами развития диабетической кардиомиопатии [6, 7, 9]. Поскольку эти изменения выражены значительно сильнее у старых животных (как при СД, так и в группе СД+ГТ), можно рассматривать отмеченные возрастные различия как морфологическое проявление более тяжелых осложнений СД в сердечно-сосудистой системе при старении.

Гистологическое исследование почек. При исследовании почек животных обеих возрастных групп со стрептозотоцин-индуцированным СД отмечено развитие диффузного мезангиального склероза вследствие утолщения базальной мембраны клубочковых капилляров за счет отложения гиалиноподобных масс. Отличительной особенностью гломерулосклероза, развивавшегося при моделировании СД, был диффузный характер поражения почечных клубочков, преимущественно юкстамедуллярных нефронов, а также тубулоинтерстициальный нефрит. Он характеризовался развитием умеренного очагового отека интерстициальной соединительной ткани в мозговом слое почек, расширением просветов проксимальных канальцев, белковой дистрофией их канальцевого эпителия, а также наличием в умеренно расширенных просветах дистальных канальцев почек гиалиновых цилиндров, свидетельствующих о развитии протеинурии. У старых мышей характер патологических изменений, развивающихся в почках при стрептозотоцин-индуцированном СД, был аналогичным, однако отличался по степени выраженности и распространенности, обусловленных развитием в почках возрастных склеротических изменений. Особенно глубокие изменения затрагивали микроциркуляторное русло, базальные мембраны и эндотелиальные клетки капилляров.

В почках молодых мышей с СД, подвергавшихся генной терапии, обнаружены морфологические изменения, свидетельствующие о ее выраженном положительном эффекте. Отмечено уменьшение структурных повреждений не только почечных клубочков, но также и тубулярного аппарата. В то же время индуцированные стрептозоточином повреждения канальцевого аппарата в виде зернистой дистрофии и отека цитоплазмы эпителия, преимущественно проксимальных канальцев, PEI-pDNA комплекс полностью не устранял. В почках старых мышей с СД, которые подвергались ГТ, в отличие от молодых, отмечался комплекс деструктивно-дистрофических изменений (рис. 5).

В корковом и мозговом веществе часто встречались клубочки с очаговым склерозом, вокруг интратубулярных артерий часто выявляли хорошо сформированные, достаточно крупные очаги лимфоидной инфильтрации, окружавшие сосуд по типу «муфты». При этом стенки таких артерий были утолщены за счет отека всех слоев, а иногда – плазматического пропитывания и гиалиноза. Также у старых мышей группы СД+ГТ, в отличие от молодых, часто

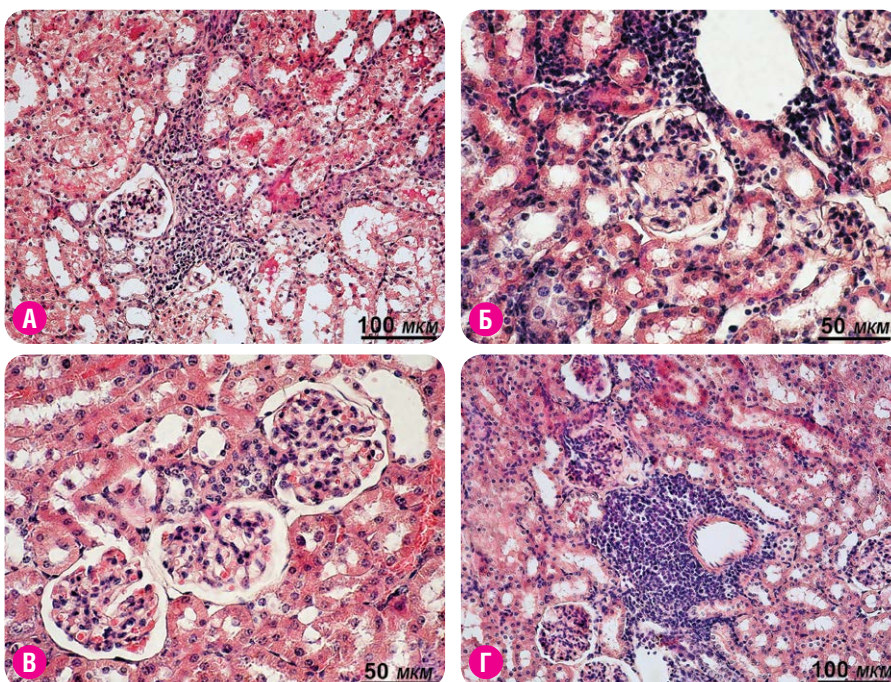


Рис. 5. Микрофотографии препаратов почек старых мышей в группе СД+ГТ: А – лимфо-лейкоцитарная инфильтрация стромы с исходом в склероз; Б – очаговый склероз почечного клубочка; В – очаговое расширение и полнокровие клубочковых капилляров; Г – периваскулярный очаг лимфоидной инфильтрации в виде муфты на фоне склероза почечных клубочков. Световая микроскопия, окраска гематоксилин-эозином.

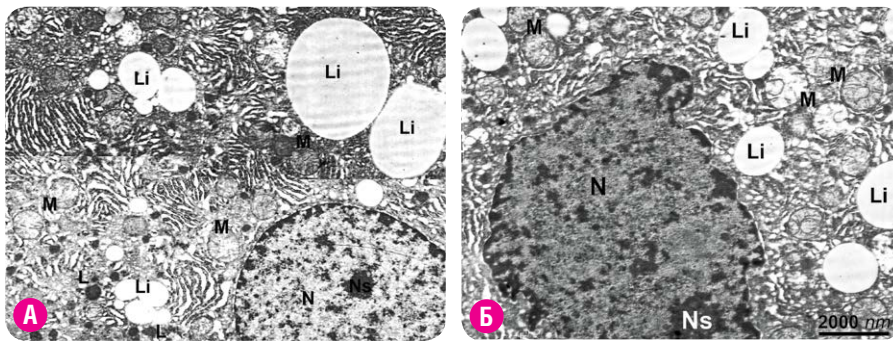
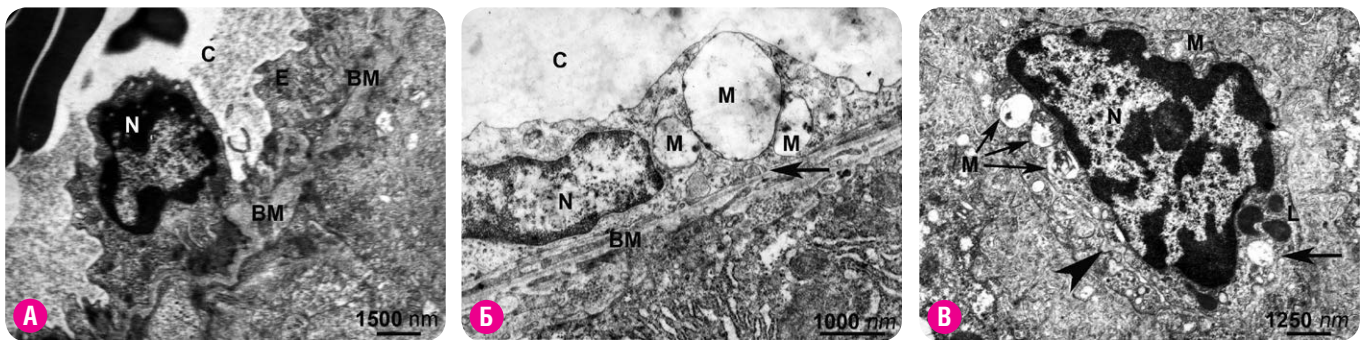


Рис. 7. Микрофотографии препаратов печени старых мышей групп СД (А) и СД+ГТ (Б, В). Ультраструктурные изменения кровеносных капилляров: А – гетерохроматизация ядра, очаговые изменения толщины базальной мембраны; Б – отек и набухание митохондрий с деструкцией крист, увеличение количества и полиморфизм микровезикул в базальном отделе цитоплазмы с формированием мультивезикулярных ассоциаций, очаговое расширение и уплотнение базальной мембраны; В – капилляр закрытого типа с резко суженным просветом (▶), гетерохроматизация ядра и деструкция митохондрий с образованием пузырей (↑) и миелоноподобных телец (→). Электронная микроскопия.

Примечания: ВМ – базальная мембрана, М – митохондрия, Л – лизосома, С – просвет капилляра, Е – эндотелиоцит, N – ядро.

Рис. 6. Микрофотографии препаратов печени старых мышей группы СД+ГТ. Ультраструктурные изменения в гепатоцитах: А – уплотнение цитоплазмы за счет компактного расположения органелл, расширение зернистой эндоплазматической сети, просветление матрикса митохондрий, дезорганизация и частичная деструкция крист, накопление крупных липидных включений (Li) и лизосом (L) в цитоплазме, уплотнение ядрышек в ядре; Б – гипертрофия ядра, извилистость контуров его мембраны и уплотнение кариоплазмы с гиперконденсацией глыбок хроматина, увеличение количества дистрофически измененных органелл и липидных включений в цитоплазме. Электронная микроскопия.

Примечания: Li – липидные включения, L – лизосома, М – митохондрия, N – ядро, Ns – ядрышко.



отмечали наличие в соединительнотканной строме органа очагов лимфо-гистиоцитарной инфильтрации с исходом в склероз.

Проведенные иммуногистохимические и морфометрические, а также электронномикроскопические исследования показали резкое по сравнению с контролем увеличение интенсивности процесса апоптоза в почках мышей при стрептозотонин-индуцированном СД и его заметное снижение при генной терапии с помощью PEI-pDNA комплекса у молодых, что указывает на выраженный протекторный эффект этого воздействия. Вместе с тем протекторный эффект PEI-pDNA комплекса напрямую зависит от возраста экспериментальных животных, определяющего особенности и характер развития возрастной патологии. У молодых животных со стрептозотонин-индуцированным СД введение плазмидного комплекса приводило к существенному снижению индекса апоптоза (Me AI 7,95 TUNEL⁺ клеток/мм² – при СД; 5,72 TUNEL⁺ клеток/мм² – при СД+ГТ). У старых – это снижение было несколько меньшим, индекс апоптоза составлял 9,37 TUNEL⁺ клеток/мм² при СД и 7,58 TUNEL⁺ клеток/мм² – при СД+ГТ (табл. 1, см. с. 40).

Гистологическое исследование печени. Гистологические и ультраструктурные исследования печени мышей со стрептозотонин-индуцированным СД свидетельствуют о нарушении кровообращения в органе, а также о глубоких дистрофических изменениях гепатоцитов вследствие нарушения циркуляции внутриклеточной жидкости (интрацеллюлярный отек, жировая, гидропическая баллонная дистрофия) и нарушения белкового обмена (гиалиновокапельная дистрофия). В конечном итоге это приводило или к некрозу гепатоцитов, или к их гибели путем апоптоза. Многочисленные исследования

гистологических изменений в печени при моделировании СД путем введения стрептозотонина или аллоксана указывают на развитие стеатоза, вплоть до стеатогепатита, и фиброза, что наблюдается также у людей с СД [18].

Структурные и ультраструктурные изменения в печени старых мышей при стрептозотонин-индуцированном СД были выражены сильнее, чем у молодых (рис. 6, 7). Они характеризуются нарушением балочного строения органа, выраженными нарушениями стенки кровеносных сосудов, деструкцией эндотелия и тканевой реакцией на его повреждение в виде очагов лимфо-лейкоцитарной инфильтрации, развивающихся непосредственно под слоем эндотелия. Также отмечались выраженные дистрофические и некротические изменения гепатоцитов, а также их апоптоз; развитие на месте гибели гепатоцитов очагов лимфо-лейкоцитарной и лимфо-макрофагальной инфильтрации, с последующей их трансформацией в лимфо-макрофагальные и/или макрофагальные гранулемы. Стеатоз был развит значительно сильнее, чем у молодых со стрептозотонин-индуцированным СД. Периваскулярный фиброз имел преимущественно очаговый характер.

Наблюдались деструктивные изменения митохондрий гепатоцитов в виде очагового просветления матрикса, дисконформации и деструкции крист, формирования миелоноподобных телец, нарушения целостности митохондриальных мембран. Нарушение функций митохондрий печени при СД было отмечено многими исследователями, как у людей, так и при моделировании этой патологии у животных [8, 19-20]. Снижение уровня потребления кислорода, окислительного фосфорилирования и синтеза АТФ в митохондриях при СД является

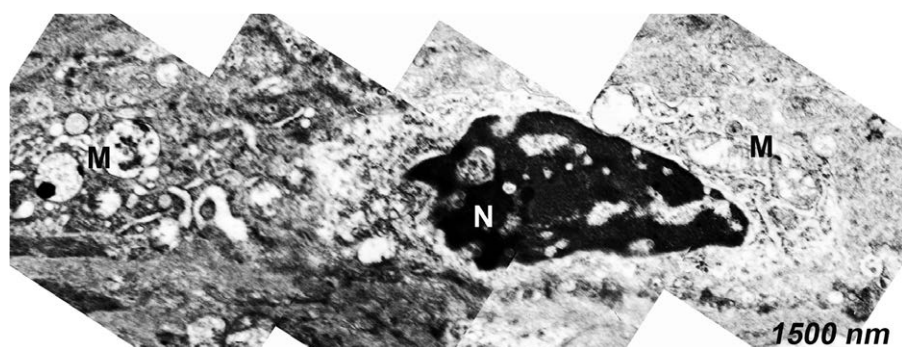


Рис. 8. Объединение микрофотографий препаратов печени старой мыши группы СД+ГТ: апоптоз звездчатого макрофагоцита (клетка Купфера). Электронная микроскопия.

Примечания: М – митохондрия, N – ядро.

отражением и следствием повреждений их ультраструктуры. Можно предположить, что функциональные нарушения энергообразующей системы клеток печени при СД (как и структурные) проявляются в большей степени в старшие возрастные периоды.

У молодых животных с применением PEI-pDNA комплекса отмечены полная сохранность балочного строения печени, незначительные дистрофические изменения гепатоцитов в виде отека и вакуолизации их цитоплазмы. При этом отмечались регенеративные изменения, направленные на поддержание тканевого гомеостаза, нарушенного воздействием стрептозотцина. Такие перестройки проявлялись увеличением количества двуядерных гепатоцитов, гиперплазией зернистой эндоплазматической сети, а также увеличением митотической активности гепатоцитов.

При электронно-микроскопическом исследовании также отмечена меньшая распространенность и выраженность деструктивных изменений в гепатоцитах и структурах микроциркуляторного русла. При этом в гепатоцитах обнаружены структурные признаки высокой функциональной активности, что проявлялось гипертрофией цитоплазмы, ядер и ядрышек, увеличением извилистости контура ядерной оболочки, гиперплазией митохондрий, в основном конденсированного типа, и «молодых» органелл, тесно контактировавших с многочисленными профилями зернистой эндоплазматической сети. Кроме того, положительный эффект воздействия PEI-pDNA комплекса при стрептозотцин-индуцированном СД на структуру печени молодых животных характеризовался заметным уменьшением частоты развития моноцелюлярного некроза и апоптоза гепатоцитов.

В печени старых мышей со стрептозотцин-индуцированным СД и применением PEI-pDNA комплекса на ультраструктурном уровне отмечали развитие дистрофических и деструктивных изменений разной степени выраженности (рис. 6, 7, см. с. 44). Происходило значительное уплотнение цитоплазмы гепатоцитов, на фоне заметного уменьшения количества гранул гликогена отмечали резкое увеличение количества липидных включений, что свидетельствует о развитии жировой дистрофии, расширение профилей зернистой эндоплазматической сети, снижение количества связанных рибосом на ее мембранах. Обращало на себя внимание выраженная деструкция митохондрий, в которых отмечали дискомплексацию, дезориентацию, а зачастую деструкцию крист и просветление их матрикса.

Выраженным ультраструктурным изменениям подвергались также кровеносные капилляры печени при стрептозотцин-индуцированном СД и генной терапии (в большей степени у старых мышей). В их эндотелии часто выявляли гетерохроматизацию и изменение формы ядра, деструкцию органелл, а также формирование многочисленных вакуолей и пузырей. Просветы капилляров при этом заметно сужались, что приводило к формированию капилляров закрытого типа. Обращало на себя внимание значительное утолщение базальной мембраны капилляров, нередко ее редупликация, формирование паравасального фиброза (рис. 7).

Деструктивным изменениям подвергались и звездчатые макрофагоциты (клетки Купфера), в которых на ультраструктурном уровне

не часто обнаруживали выраженную гетерохроматизацию ядра и другие изменения, характерные для развития апоптоза (рис. 8).

Применение TUNEL-метода показало резкое, по сравнению с контролем, увеличение интенсивности процессов апоптоза в печени мышей при индуцированном СД (гепатоциты, эндотелиоциты капилляров, Купферовские клетки, а также лимфоциты в периваскулярных очагах инфильтрации) и ее заметное снижение при воздействии PEI-pDNA комплекса, что указывает на его выраженный протекторный эффект. Если у молодых животных со стрептозотцин-индуцированным СД введение плазмидного комплекса приводило к существенному снижению индекса апоптоза (Me AI 11,62 TUNEL⁺ клеток/мм² – при СД; 6,10 TUNEL⁺ клеток/мм² – при СД+ГТ), то у старых – это снижение было менее выраженным и индекс апоптоза составлял 10,15 TUNEL⁺ клеток/мм² при СД, 8,96 TUNEL⁺ клеток/мм² – при СД+ГТ (табл. 1, см. с. 40). Таким образом, протекторный эффект генной терапии существенно зависит от возраста экспериментальных животных и определяется не только степенью выраженности патологических процессов в разном возрасте, но также и диапазоном восстановительных реакций.

Итак, как показали наши исследования, нормализация структурной и ультраструктурной организации внутренних органов, в наибольшей степени подверженных диабетической дисфункции, основных морфометрических параметров панкреатических островков и морфофункциональных особенностей β-клеток, а также показателей апоптоза в изученных органах (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 в данной возрастной группе. Кроме того, применение генной терапии стимулировало развитие компенсаторно-приспособительных, гиперпластических процессов (миокард, печень), что является существенным показателем ее протекторного эффекта у молодых животных.

У старых животных отмечено резкое усиление, по сравнению с молодыми, деструктивно-дистрофических процессов в изученных органах при моделировании СД, что сочеталось с драматическим усилением клеточной гибели путем апоптоза. Применение генной терапии у старых животных с индуцированным СД приводило к развитию выраженной морфологической гетерогенности тканей, что также является одной из характерных черт структурных проявлений старения [11]. Отмечается как незначительное улучшение структуры и ультраструктуры клеток, составляющих основную функциональную единицу органов и их микроциркуляторного русла, так и ухудшение многих параметров их структурной и ультраструктурной организации, усиление лейко-лимфоцитарной инфильтрации (почка, миокард), сохранение высокой интенсивности апоптотической гибели клеток (или же ее усиление в панкреатических островках), развитие осложнений (острый инсульт).

Полученные результаты свидетельствуют о существенной роли возрастного фактора в патоморфозе СД и при разработке новых

подходов для его коррекции. Возрастной аспект этой проблемы приобретает особое значение не только в связи с резким увеличением распространенности данной патологии с возрастом, но также и в связи с тем, что ряд проявлений СД по своим морфологическим характеристикам напоминает возрастные изменения, типичные для нормального физиологического старения [11, 17]. По-видимому, предсуществующие возрастные морфофункциональные изменения внутренних органов (в которых чаще всего проявляются осложнения при СД), в свою очередь, способствуют развитию более глубоких диабетических повреждений, что подтверждается полученными нами данными.

Одной из возможных причин отмеченных нами возрастных различий могут быть и предсуществующие возрастные изменения поджелудочной железы, определяющие характер развития как патологического процесса при СД, так и реактивных изменений в от-

вет на корректирующие воздействия в старости. Несмотря на наличие противоречивых данных, в литературе доминирует точка зрения об ухудшении функции β -клеток, о снижении их пролиферативной активности и повышении уровня апоптоза при старении [21-23]. В то же время многочисленные исследования, выполненные на животных моделях, а также на пациентах с СД, связанные с изучением механизмов повреждения, смерти, регенерации и адаптации β -клеток, свидетельствуют о том, что они обладают большей пластичностью, чем предполагалось ранее, что позволяет считать их перспективной мишенью для поиска путей возможного лечения СД [14, 23-24]. Проведение подобных исследований целесообразно и для старших возрастных групп, поскольку они могут способствовать выяснению характерных особенностей корректирующих воздействий при этом заболевании в старости.

ВЫВОДЫ

Полученные с помощью гистологических, электронномикроскопических, гистохимических и иммуногистохимических, а также морфометрических исследований данные свидетельствуют о том, что корректирующие воздействия генной терапии на морфофункциональные характеристики внутренних органов при стрептозотоцин-индуцированном сахарном диабете проявляют различную эффективность в разном возрасте.

Отмечены высокая степень эффективности применения генной терапии у молодых и незначительный эффект, его отсутствие или дополнительное ухудшение — у старых, что проявлялось по-разному в разных тканях, клетках и микроциркуляторном русле.

Протекторный эффект генной терапии напрямую зависит от возраста экспериментальных животных, определяющего не только особенности и характер развития патологического процесса, но также уровень и диапазон восстановительных реакций. Результаты исследования свидетельствуют о необходимости учитывать возрастной фактор при разработке стратегии лечения сахарного диабета.

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Shaw J. E., Sicree R. A., Zimmet P. Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract.* 2010. **87**, № 1. P. 4-14.
2. World Health Organization Media Centre. URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>. Accessed 2010 Sep 26.
3. International Diabetes Federation: Diabetes Atlas. 8th Ed. 2018. URL: http://www.diabetesatlas.org/index.php?option=com_attachments&task=download&id=194:DF_Atlas_8e_EN.
4. Коркушко О. В., Шатило В. Б., Чижова В. П. Инсулинорезистентность и нарушенная толерантность к глюкозе в разные возрастные периоды. *Эндокриология.* 2010. **15**, № 2, С. 205-213.
5. Коркушко О. В., Шатило В. Б., Ищук В. А., и др. Инсулинорезистентность как фактор ускоренного старения. *Пробл. старения и долголетия.* 2012. **21**, № 3. С. 357-367.
6. Boudina S., Abel E. D. Diabetic cardiomyopathy, causes and effects. *Rev Endocr Metab Disord.* 2010. **Vol. 11**. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s11154-010-9131-7>.
7. Murarka S., Movahed M.R. Diabetic cardiomyopathy. *J of Cardiac Failure.* 2010. **16**, № 12. P. 971-979.
8. Dobias L., Petrova M., Vojtko R., et al. Effect of Sulodexide on Vascular Responses and Liver Mitochondrial Function in Diabetic Rats. *Physiol Res.* 2015. **64**, № 4. P. S497-S505.
9. Radovits T., Korkmaz S., Matyas C., et al. An Altered Pattern of Myocardial Histopathological and Molecular Changes Underlies the Different Characteristics of Type-1 and Type-2 Diabetic Cardiac Dysfunction. *J Diabetes Research.* 2015. 12 p. URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/728741>.
10. Raparia K., Usman I., Kanwar Y. S. Renal Morphological Lesions Reminiscent of Diabetic Nephropathy. *Arch Pathol Lab Med.* 2013. **137**. P. 351-359.
11. 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.
12. De Vriese A. S., Verbeuren T. J., Van de Voorde J., et al. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol.* 2000. **130**. P. 963-974.
13. Sena C. M., Pereira A. M., Seica R. Endothelial dysfunction – a major mediator of diabetic vascular disease. *Biochim Biophys Acta.* 2013. № 1832. P. 2216-2231.
14. Coppeters 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.
15. Топорова О. К., Кириленко С. Д., Иродов Д. М., та ін. Плазмідний вектор для доставки гена препроінсуліну людини в клітини свавців. *Біополімери і клітина.* 2007. **23**, № 2. С. 100-107. URL: <http://www.biopolymers.org.ua/pdf/uk/23/2/100/>.
16. Квитницкая-Рыжова Т. Ю., Луговской С. П., Клименко П. П., и др. Влияние генной терапии на морфофункциональные особенности поджелудочной железы при экспериментальном сахарном диабете. *Пробл. старения и долголетия.* 2015. **24**, № 3-4. С. 226-238.
17. Квитницкая-Рыжова Т. Ю., Луговской С. П., Клименко П. П., и др. Влияние генной терапии на морфологические показатели поджелудочной железы при экспериментальном сахарном диабете у мышей разного возраста. *Пробл. старения и долголетия.* 2016. **25**, № 3. С. 434-449.
18. Bilal H. M., Riaz F., Munir K., et al. Histological changes in the liver of diabetic rats: A review of pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease in type 1 diabetes mellitus. *Cogent Medicine.* 2016. № 3. URL: <http://dx.doi.org/10.1080/2331205X.2016.1275415>.
19. Cheshchevik V. T., Dremza I. K., Lapshina E. A., et al. Corrections by melatonin of liver mitochondrial disorders under diabetes and acute intoxication in rats. *Cell Biochim Funct.* 2011. **29**, № 6. P. 481-488.
20. Koliaki C., Roden M. Hepatic energy metabolism in human diabetes mellitus, obesity and non-alcoholic fatty liver disease. *Mol CellEndocrinol.* 2013. **379**, № 1, 2. P. 35-42.

21. Gunasekaran U., Gannon M. M. Type 2 Diabetes and the Aging Pancreatic Beta Cell. *Aging*. 2011. **3**, № 6. P. 565-575.
22. Mizukami H., Takahashi K., Inaba W., et al. Age-associated changes of islet endocrine cells and the effects of body mass index in Japanese. *J Diabetes Investig*. 2014. **5**, № 1. P. 38-47.
23. Yagihashi S., Inaba W., Mizukami H. Dynamic pathology of islet endocrine cells in type 2 diabetes: β -cells growth, death, regeneration and their clinical implications. *J Diabetes. Investig*. 2016. **7**, № 2. P. 155-165.
24. Brereton M. F., Iberl M., Shimomura K., et al. Reversible changes in pancreatic islet structure and function produced by elevated blood glucose. *Nat Commun*. 2014. № 5. P. 4639. DOI:10.1038/ncomms5639 | www.nature.com/naturecommunications.



СТАТЬЯ НА САЙТЕ
TRANSPLANTOLOGY.ORG

Авторы подтверждают отсутствие возможных конфликтов интересов.

Поступила в редакцию 05.04.2018 г.

Принята к печати 30.05.2018 г.