

Ю.М. Колесник, А.В. Траїлін, М.А. Орловський

## Вивчення проявів апоптозу при стрептозотоциновому цукровому діабеті

*Изучали проявления апоптоза в поджелудочной железе, мозгу и миокарде у крыс при развитии сахарного диабета 1-го типа. Для идентификации клеток, вступивших на путь апоптоза, с помощью TUNEL-метода определялись специфические повреждения молекулы ДНК. После докрасивания срезов метиленовым зеленым наблюдались специфические для апоптоза изменения состояния хроматина и клеточных мембран. Кроме того, апоптотические и неапоптотические клетки дифференцировались автоматически с помощью системы компьютерного анализа изображения по показателю оптической плотности ядер. Применение указанного подхода позволило с высокой степенью достоверности установить, что у здоровых животных апоптотические клетки присутствуют во всех изученных тканях, однако возможность их выявления TUNEL-методом зависит от способа фиксации биоматериала. Развитие сахарного диабета сопровождается увеличением количества таких клеток, что свидетельствует о важной роли апоптоза в патогенезе диабета 1-го типа.*

### ВСТУП

Апоптоз, як і некроз, є основним механізмом загибелі клітин. На відміну від некрозу, який являє собою процес загибелі клітини внаслідок інтенсивної дії на неї пошкоджувальних агентів, апоптоз – це активний, генетично запрограмований “суїцид” клітини [9], який виникає у відповідь на мінімальне пошкодження, а також спостерігається за фізіологічних умов.

За допомогою апоптозу відбувається: загибель клітин під час ембріогенезу; елімінація клітин, які змінили свою антигенну структуру внаслідок мутації ДНК; здійснюється регуляція кількості клітин у тканинах дорослого організму [14]. З іншого боку, надмірна активація апоптозу, за даними деяких авторів, є одним із головних механізмів патогенезу таких захворювань, як цукровий діабет 1-го типу [18], атеросклероз [11], хвороба Альцгеймера [29], кардіоміопатії [4].

Добре відомо, яку важливу медико-соціальну проблему являє собою цукровий діабет [2]. Вагомими факторами, що визначають тяжкість перебігу цієї патології разом із гіперглікемією є її ускладнення – мікроангіопатія, нефропатія, нейропатія, міокардіодистрофія [1]. На жаль, нині немає єдиної точки зору на механізми загибелі клітин у цих органах при цукровому діабеті. Дані окремих робіт свідчать про провідну роль некротичного механізму загибелі нейронів [15], кардіоміоцитів [13], а також самих  $\beta$ -клітин підшлункової залози [7]. Разом з тим завдяки вдосконаленню методів досліджень з'являється все більше доказів апоптотичного механізму загибелі клітин у цих органах [10, 13, 19, 20, 24].

Головними маркерами апоптозу є специфічні пошкодження молекули ДНК з утворенням її олігонуклеосомальних фрагментів, специфічні зміни стану цитозоля, цитоплазматичної мембрани, мітохонд-

рій, а також так звані медіатори апоптозу [5, 8, 25, 26]. Для їх виявлення може бути використано світлову та електронну мікроскопію, імуноблотинг, імунопреципітацію, проточну цитофлуориметрію, саузерн-гібридизацію, фотометрію, електрофорез, полімеразну ланцюгову реакцію, імуноцито- та імуногістохімію [5, 8]. Оптимальним для виявлення клітин, причиною загибелі яких є апоптоз, вважається використання сполучення декількох маркерів і методик їх виявлення, оскільки при цьому значно підвищується інформативність дослідження [5, 8, 25].

Недоліком деяких методик є висока вартість реактивів і обладнання, довга тривалість дослідження, неможливість його проведення на клітинах, які були фіксовані на гістологічних зрізах, а також неможливість кількісного аналізу результатів реакції [5].

Однією із методик, що найбільш широко використовується, є TUNEL-методика (Terminal deoxynucleotidil transferase-mediated nick end labeling), запропонована Gravieli та співавт. [12]. Вона оснований на виявленні утворених при апоптозі олігонуклеосомальних фрагментів молекули ДНК імуноцитохімічним або імуногістохімічним методом. Позитивним є коротка тривалість, висока чутливість і специфічність, спроможність виявляти клітини на початкових стадіях апоптозу, а також можливість виявлення клітин *in situ* в тканинних зрізах [25].

Метою цієї роботи було імуногістохімічне виявлення апоптотичних змін у підшлунковій залозі, мозку та міокарді при розвитку цукрового діабету 1-го типу за допомогою використання методики TUNEL у комбінації з вивченням морфологічних змін в апоптотичних клітинах.

## МЕТОДИКА

Дослідження проведено на 40 щурах лінії Вістар масою 200 – 250 г, яких розділили

на дві групи: здорові (n=12) і хворі на цукровий діабет 1-го типу 5-тижневої тривалості перебігу (n=28). Цукровий діабет моделювали одноразовим внутрішньоочеревинним введенням стрептозотоцину (“Sigma”, США) в дозі 50 мг/кг, розведеного в 0,5 мл 0,1 моль/л цитратного буфера [21]. Час введення препарату розцінювався як початок розвитку захворювання. Кожний тиждень визначали концентрацію глюкози в крові глюкозооксидазним методом за допомогою приладу “One Touch II®” (“Life Scan, Johnson and Johnson”, США).

На 35-ту добу експерименту здорових тварин, а також щурів з вірогідними ознаками діабету (гіперглікемія більш ніж 15 ммоль/л, підтверджена двома послідовними замірами) розділили на 4 групи (по 3 здорових щурів і по 5 тварин з діабетом) і декапітували під етаміналовим наркозом (40 мг/кг).

Перед декапітацією тварин 1-ї групи перфузували транскардіально 50 мл фіксатора Буена. У тварин 2-ї і 3-ї груп аналогічну перфузію здійснювали з використанням фіксатора Карнуа та 70 %-го етилового спирту. Потім мозок, підшлункову залозу, фрагмент міокарда у ділянці лівого шлуночка негайно видаляли і поміщали у відповідні фіксатори на 20 год при кімнатній температурі. Після фіксації та стандартної процедури зневоднювання і насичування хлороформом і парафіном органи заливали в парафін.

На ротаційному мікротомі робили серійні зрізи підшлункової залози (по 3 зрізи з різних відділів) і міокарда завтовшки 5 мкм, а також фронтальні серійні зрізи середнього відділу гіпоталамуса завтовшки 14 мкм (на 5-ти рівнях через 1 мм), які потім депарафінували у ксилолі, регідратували у низхідних концентраціях етанолу (100, 96, 70 %) і тричі по 5 хв відмивали у тріс-буфері (рН 7,6).

У 4-й групі наркотизованих тварин зразу після забою забирали підшлункову залозу,

фрагмент міокарда та мозок і швидко заморозували у рідкому азоті, а потім готували їх кріостатні зрізи аналогічної товщини. Після виймання з холодильника зрізи на скельцях були фіксовані в 4 %-му забуференому формаліні протягом 15 хв, висушені на повітрі та тричі по 5 хв відмиті у тріс-буфері (рН 7,6).

Використання нами набору реагентів FragEL (“Oncogene research products”, США) дало змогу ідентифікувати у тканинних зрізах клітин, що гинуть через апоптоз, по-перше, TUNEL-методом за наявності в них специфічно пошкодженої молекули ДНК, і, по-друге, за допомогою паралельного виявлення специфічних для апоптозу морфологічних змін у клітинах при дофарбуванні тканини гістологічним барвником.

Головним етапом TUNEL-методу є реакція приєднання до утворених під час апоптозу 3-ОН-кінців олігонуклеосомальних фрагментів молекули ДНК, сполучених з біотином деоксинуклеотидів з деоксинуклеотидилтрифосфату (dCTP), яка каталізується ферментом термінальною деоксинуклеотидилтрансферазою (TdT) [12]. Далі нуклеотиди взаємодіють із кон'югатом стрептавідин – пероксидаза. При додаванні діамінобензидину та  $H_2O_2$  пероксидаза каталізує окиснення діамінобензидину з утворенням темно-коричневого нерозчинного продукту реакції в місцях фрагментації ДНК. Дофарбування зрізів метиленовим зеленим дозволяє морфологічно диференціювати нормальні, апоптотичні та некротичні клітини.

Негативний контроль реакції проводився за допомогою аналогічної обробки зрізів із заміною TdT еквівалентною кількістю дистильованої води, а для позитивного контролю зрізи було оброблено DNase I (“Sigma-Aldrich”, США), яка пошкоджує молекулу ДНК з утворенням 3-ОН-фрагментів [6]. Крім того, досліджувалися додані до набору контрольні скельця, на од-

не з яких були нанесені лейкемічно трансформовані промієлоцити клітинної лінії HL 60, а на друге – ті самі клітини, що були інкубовані з актіноміцином Д для індукції апоптозу.

Препарати вивчалися за допомогою світлової мікроскопії на мікроскопі “Axioscop” (“Zeiss”, Німеччина). Ідентифікувалися клітини зі специфічними для апоптозу морфологічними змінами: конденсацією хроматину та його агрегацією біля внутрішньої поверхні ядерної мембрани, утворенням пухирців на ядерній і цитоплазматичній мембранах [14, 27]. Позитивним результатом визнавали виявлення в клітинах цієї групи ядер, зафарбованих у темно-коричневий колір, а також виявлення темно-коричневих апоптотичних тілець. TUNEL-негативними визнавали клітини з ядрами, які зафарбовані у світлі відтінки зеленого, голубого або коричневого кольорів. Виявлення груп клітин, дифузно фарбованих метиленовим зеленим, свідчило про їх загибель через некроз.

Оскільки при візуальній оцінці зрізів було помічено очевидні відміни в інтенсивності фарбування апоптотичних і неапоптотичних клітин, для більш точного їх диференціювання зображення за допомогою високочутливої відеокамери СОНУ-4922 (“СОНУ Inc.”, США) вводилося до комп'ютерної системи аналізу зображення VIDAS-386 (“Kontron Electronic”, Німеччина) та оцифровувалося за денситометричною шкалою з 256 градаціями сірого кольору. В інтерактивному режимі позначалися контури ядер і потім автоматично визначалася їх оптична густина, пов'язана зі вмістом у них продукту окиснення діамінобензидину та (або) метиленового зеленого. На підставі показника оптичної густини ядер здійснювалася автоматична класифікація клітин і визначався відсоток клітин кожного класу.

При дослідженні гістологічних зрізів міокарда та підшлункової залози в її екзо-

кринній частині, а також контрольних скелець вивчали 5 полів зору після чого підраховували апоптотичний індекс (АІ) за формулою: кількість позитивно фарбованих клітин в полі зору /загальна кількість клітин в полі зору  $\times 100$  % [16, 28].

Для оцінки інтенсивності апоптотичних процесів у ендокринній тканині підшлункової залози було досліджено 100 острівців Лангерганса кожної залози. Визначали відсоток острівців, що містили апоптотичні клітини і АІ в них за формулою: кількість позитивно зафарбованих клітин в площі зрізу острівця /загальна кількість клітин в площі зрізу острівця  $\times 100$  %.

При світловій мікроскопії гістологічних зрізів середнього відділу гіпоталамуса досліджували стан нейронів аркуатного, вентромедіального ядер гіпоталамуса та латерального гіпоталамічного поля. Вибір для дослідження вказаних структур гіпоталамуса в зумовлений показаною раніше співробітниками нашої кафедри залежністю морфофункціональної активності локалізованих у них нейронів від стану ендокринної функції підшлункової залози, що особливо чітко проявлялося під час розвитку цукрового діабету [3]. Підраховували АІ за формулою: кількість позитивно зафарбованих клітин у площі зрізу структури /загальна кількість клітин в площі зрізу структури  $\times 100$  %.

Мікрофото були надруковані на цифровому принтері Olympus Camedia 330NE ("Olympus Optical Company", Ltd., Японія).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При аналізі гістологічних препаратів підшлункової залози, міокарда та мозку, фіксованих за Буеном і Карнуа (отриманих від здорових тварин і від щурів з цукровим діабетом), відзначено відсутність у них TUNEL-позитивних клітин.

Водночас такі клітини було виявлено нами в зразках тканин, що були фіксовані

в 70%-му етиловому спирті та залиті в парафін, а також у криостатних зрізах, фіксованих у 4%-му розчині формальдегіду в фосфатному буфері. Таким чином, нами встановлено явну перевагу даних способів обробки матеріалу при виявленні клітин, що гинуть через апоптоз. Крім того, показано, що фіксація за методом Буена або Карнуа робить неможливим зв'язування ферменту TdT з 3-ОН кінцевими фрагментами молекули ДНК.

Вивчаючи гістологічні зрізи підшлункової залози (екзо- й ендокринної частин), міокарда та гіпоталамуса здорових тварин, відзначено наявність у цих тканинах клітин, які гинуть через апоптоз (рисунк). TUNEL-позитивні клітини було виявлено лише в 3 % острівців Лангерганса, причому в середньому АІ в них становив 0,6 – 1,2 %. В екзокринній тканині підшлункової залози та міокарді він був 2 – 4 %. У ділянках аркуатного та вентромедіального ядер гіпоталамуса, а також латерального гіпоталамічного поля цей показник не перевищував 4 % у кожній структурі. При дослідженні контрольних скелець спостерігалось значне збільшення АІ серед клітин лінії HL 60, оброблених актиноміцином Д: 42 % порівняно 3 % у контролі.

Проведена нами класифікація клітин за показником оптичної густини ядер виявила наявність у всіх тканинах двох класів клітин з високою (мабуть апоптотичних) і з низькою оптичною густиною ядер (неапоптотичних). Слід зазначити, що АІ в усіх тканинах вірогідно не відрізнявся при візуальному і автоматичному способах його оцінки.

Розвиток цукрового діабету протягом 5 тиж супроводжувався збільшенням АІ практично в усіх тканинах, крім екзокринної частини підшлункової залози (рисунок). Крім того, в острівцях Лангерганса, міокарді, гіпоталамічних ядрах у тварин з цукровим діабетом відмічали також появу ок-

ремих клітин і їх груп з ознаками некрозу. Для екзокринної частини підшлункової залози АІ не змінювався, що узгоджується з даними праці Hughsteeen [7].

Слід зазначити, що в ендокринній частині залози збільшувалася не тільки кількість острівців Лангерганса, які містили

апоптотичні клітини, але й АІ. При цьому TUNEL-позитивні клітини переважно виявлялись у великих острівцях і локалізувалися в їх центральній частині.

Аналіз гістологічних зрізів гіпоталамуса у тварин з діабетом показав, що збільшення АІ було більш виразним у ділянці вендро-

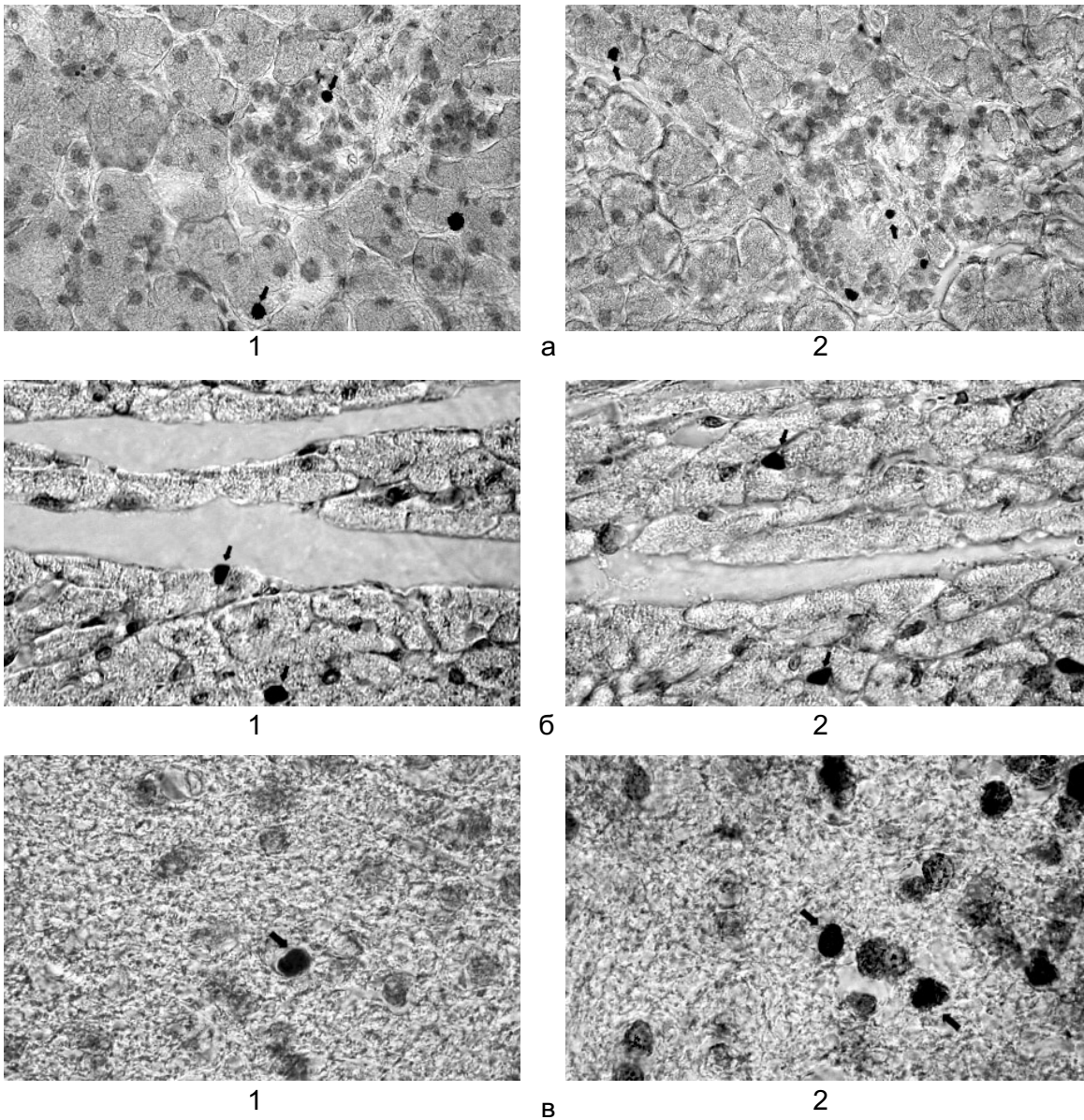


Рис. 1. Апоптотичні клітини (ядра вказано стрілками) в екзо- та ендокринній частинах підшлункової залози (а), в міокарді у шурів (б), в ділянці вендромедіального ядра гіпоталамуса (в) у шурів у нормі (1) та при стрептозоточиновому цукровому діабеті (2) x 400

медіального ядра порівняно з аркуатним ядром та латеральним гіпоталамічним по-лем.

Таким чином, отримані результати підтверджують думку деяких дослідників про загибель  $\beta$ -клітин, кардіоміоцитів і гіпоталамічних нейронів при діабеті 1-го типу через апоптоз [10, 13, 17, 19, 20, 24].

Результати проведеного дослідження свідчать про високу специфічність застосованого нами підходу для ідентифікації клітини, що гинуть через апоптоз. Проте залишається цікавим вивчення ранніх стадій апоптозу, які пов'язані з участю оксиду азоту, каскадами ферментативного протеолізу цитоплазматичних протеїнів і звільненням  $\text{Ca}^{2+}$  з мітохондрій завдяки формуванню РТР-каналів [22, 23].

## ВИСНОВКИ

1. Можливість виявлення клітин, що гинуть через апоптоз, у тканинних зрізах за допомогою TUNEL-методу залежить від способу фіксації матеріалу.

2. Застосування TUNEL-методу разом із вивченням морфологічних змін у клітинах і наступною комбінованою (візуальною та цифровою) оцінкою зображення є оптимальним методом виявлення у тканинних зрізах клітин, що гинуть через апоптоз.

3. Апоптоз є одним з механізмів пошкодження ендокринних клітин острівців Лангерганса, кардіоміоцитів і нейронів гіпоталамічних ядер при цукровому діабеті 1-го типу.

**Y. M. Kolesnik, A. V. Trailin, M. A. Orlovsky**

## STUDY OF APOPTOSIS MANIFESTATIONS IN TYPE I DIABETES MELLITUS

The aim of this work was to study manifestations of apoptosis in pancreas, brain and myocardium of rats at the type I diabetes mellitus. To reveal the apoptotic changes in cells, specific damages of DNA were identified by the TUNEL-method. Specific for apoptosis changes in chromatin and cell membranes were found after counterstaining of a specimen

by methyl green. In addition, the apoptotic and non-apoptotic cells were differentiated automatically with the help of image analyzing computer system by an index of optical density of cellular nucleus. This method allowed to find out for sure that apoptotic cells were available in all the studied tissues of healthy animals. However the possibility of their revealing by the TUNEL-method depends on the way of tissue fixation. Development of the type I diabetes mellitus was accompanied with an increase in the number of such cells, which gives evidence for an important role of apoptosis in diabetes pathogenesis.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Балаболкин М. *Диабетология*. – М.: Мир, 2000. – 672 с.
2. Дедов И.И. Сахарный диабет в Российской Федерации: проблемы и пути решения // *Сахарный диабет*. – 1998. – № 1. – С. 7 – 19.
3. Колесник Ю.М., Василенко Г.В., Абрамов А.В. Возможные механизмы гипоталамической регуляции эндокринной функции поджелудочной железы у мышей диабетической линии C57BL/KsJ // *Архив патологии*. – 1994. – 56, № 4. – С. 56 – 60.
4. Симоненко В.Б., Бойцов С.А., Глухов А.А. Апоптоз и патология миокарда // *Клин. медицина*. – 2000. – № 8. – С. 12 – 16.
5. Фильченков А.А., Стойка Р.С. Апоптоз и рак. – К.: Морион, 1999. – 1984 с.
6. Arends M.J., Morris R.G., Wyllie A.H. Apoptosis. The role of the endonuclease // *Amer. J. Pathol*. – 1990. – 136. – P. 593 – 608.
7. Aughtsteen A.A. An ultrastructural study on the effect of streptozotocin on the islets of Langerhans in mice // *J. Electron/ Microsc. (Tokyo)*. – 2000. – 49, №.5. – P. 681 – 690.
8. Banasiaka K.J., Xiab Y., Haddad G.G. Mechanisms underlying hypoxia-induced neuronal apoptosis // *Progress in Neurobiology*. – 2000. – 62. – P. 215 – 249.
9. Carson D., Ribeiro J. M. Apoptosis and disease // *Lancet*. – 1993. – 341. – P. 1251 – 1254.
10. Chen S., Evans T., Mukherjee K. et. al. Diabetes-induced myocardial structural changes: role of endothelin-1 and its receptors // *J. Mol. Cell. Cardiol*. – 2000. – 32, № 9. – P. 1621 – 1629.
11. Geng Y.J. Regulation of programmed cell death or apoptosis in atherosclerosis // *Heart Vessels*. – 1997. – 12. – P. 76 – 80.
12. Gravrieli Y., Sherman Y., Ben-Sasson S.A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation // *J. Cell. Biol*. – 1992. – 119. – P. 493 – 501.
13. Kajstura J., Fiordaliso F., Andreoli A.M. et. al. IGF-1 overexpression inhibits the development of diabetic cardiomyopathy and angiotensin II-mediated oxidative stress // *Diabetes*. – 2001. – 50, №.6. – P. 1414 – 1424.

14. Kerr J. F., Wyllie A. H., Currie A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics // *Brit. J. Cancer.* – 1972. – **26.** – P. 239 – 257.
15. Li C., Li P.A., He Q.P. et. al. Effects of streptozotocin-induced hyperglycemia on brain damage following transient ischemia // *Neurobiol. Dis.* – 1998. – **5,** № 2. – P. 117 – 128.
16. Logsdon M.D., Meyn R.E. Jr, Besa P.C. et al. Apoptosis and the Bcl-2 gene family – patterns of expression and prognostic value in stage I and II follicular center lymphoma // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 1999. – **44.** – P. 19 – 29.
17. Mauricio D., Mandrup-Poulsen T. Apoptosis and the pathogenesis of IDDM. A question of life and death // *Diabetes.* – 1998. – **47.** – P. 1573 – 1543.
18. Moriwaki M., Itoh N., Miyagawa J. et. al. Fas and Fas ligand expression in inflamed islets in pancreas sections of patients with recent-onset Type I diabetes mellitus // *Diabetologia.* – 1999. – **42,** № 11. – P. 1332 – 1340.
19. Piotrowski P., Gajkowska B., Olszewska H., Smialek M. Electron microscopy studies on experimental diabetes and cerebral ischemia in the rat brain // *Folia Neuropathol.* – 1999. – **37,** № 4. – P. 256 – 263.
20. Russell J.W., Feldman E.L. Insulin-like growth factor-I prevents apoptosis in sympathetic neurons exposed to high glucose // *Horm. Metab. Res.* – 1999. – **31,** № 2 – 3. – P. 90 – 96.
21. Sahu A., Sninsky C.A., Kalra P.S., Kalra S.P. Neuropeptide Y concentrations in microdissected hypothalamic regions and in vitro release from the medial basal hypothalamus-optic area of streptozotocin-diabetic rats with and without insulin substitution therapy // *Endocrinology.* – 1990. – **126.** – P. 192 – 198.
22. Saviani E.E., Orsi C.H., Oliveira J.F. et al. Participation of the mitochondrial permeability transition pore in nitric oxide-induced plant cell death // *FEBS Lett.* – 2002. – **510,** № 3. – P. 136 – 140.
23. Smaili S.S., Hsu Y.T., Youle R.J., Russell J.T. Mitochondria in Ca<sup>2+</sup> signaling and apoptosis // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 2000. – **32,** № 1. – P. 35 – 46.
24. Takeuchi M., Bucala R., Suzuki T. et. al. Neurotoxicity of advanced glycation end-products for cultured cortical neurons // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* – 2000. – **59,** №12. – P. 1094 – 1105.
25. Tamura M., Kimura H., Koji T. et. al. Role of Apoptosis of Thyrocytes in a Rat Model of Goiter. A Possible Involvement of Fas System // *Endocrinology.* – 1998. – **139,** № 8. – P. 3646 – 3653.
26. Trump, B.F., Berezsky, I.K., Cowley, R.A., 1982. The cellular and subcellular characteristics of acute and chronic injury with emphasis on the role of calcium. – In: *Pathophysiology of shock, anoxia and ischemia.* Baltimore. – Williams and Wilkins, 1982. – P. 6 – 46.
27. Walker N.I., Harmon B.V., Gobe G.C., Kerr J.F.R. Patterns of cell death // *Methods Achiev. Exp. Pathol.* – 1988. – **13.** – P. 18 – 54.
28. Wang R.N., Rosenberg L. Maintenance of beta-cell function and survival following islet isolation requires re-establishment of the islet-matrix relationship // *J. Endocrinol.* – 1999. – **163.** – P. 181 – 190.
29. Wolozin Z. Neuronal loss in aging and disease. – In: *Cellular Aging and Cell Death.* New York: Wiley-Liss, 1996. – P. 289 – 300.