

И.В.Гриневич
А.М.Камышный

Запорожский государственный
медицинский университет

Ключевые слова: селезенка,
сахарный диабет, Bcl-2, p53.

Надійшла: 27.10.2010

Прийнята: 20.12.2010

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2010.4.19-23>

УДК: 616.379-008.64-092.9:[616.411-002.191.091.818:577.112]

ВЛИЯНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА НА ЭКСПРЕССИЮ БЕЛКОВ- РЕГУЛЯТОРОВ АПОПТОЗА p53 и Bcl2 В ЛИМФОИДНЫХ ФОЛЛИКУЛАХ СЕЛЕЗЕНКИ

Резюме. Проблема исследования молекулярных механизмов апоптоза и его роли в развитии аутоиммунных заболеваний, в том числе и сахарного диабета, стала в последние годы одной из самых трудных и актуальных проблем медико-биологических наук. В эксперименте исследовалось влияние экспериментального сахарного диабета на интенсивность экспрессии белков-регуляторов апоптоза Bcl-2 и p53 в селезенке крыс. Для выявления Bcl-2⁺ и p53⁺-клеток использовался иммуногистохимический метод непрямого иммунофлуоресценции с применением моноклональных антител к Bcl-2 и p53 крысы. Установлено, что развитие экспериментального сахарного диабета сопровождается однонаправленной тенденцией по увеличению количества p53⁺- и Bcl-2⁺-клеток в лимфоидных фолликулах селезенки с преимущественным снижением концентрации соответствующих белков в иммунопозитивных клетках.

Морфология. – 2010. – Т. IV, № 4. – С. 19-23.

© И.В.Гриневич, А.М.Камышный, 2010

Grinevich I., Kamyshny A. Influence of the effect of experimental diabetes mellitus on the protein expression of apoptotic regulators Bcl-2 and p53 in the lymphoid follicles of the spleen.

Summary. The problem of investigation of molecular mechanisms of apoptosis and its role in autoimmune disease, including diabetes mellitus, became one of the most difficult and actual among the medical sciences last years. Under the experiment the effect of experimental diabetes mellitus on the intensity of protein expression of apoptotic regulators Bcl-2 and p53 in the spleen of rats was investigated. To detect Bcl-2 and p53 positive-cells we used immunohistochemical technique of indirect immunofluorescence with monoclonal antibodies to Bcl-2 and p53. It was found that the development of experimental diabetes mellitus is accompanied by unidirectional tendency to increase the number of p53- and Bcl-2-positive cells in lymphoid follicles of the spleen with a preferential decrease in the concentration of these protein in immune cells.

Key words: spleen, diabetes mellitus, Bcl-2, p53.

Введение

Проблема исследования молекулярных механизмов апоптоза и его роли в развитии аутоиммунных заболеваний, в том числе и сахарного диабета, стала в последние годы одной из самых трудных и актуальных проблем медико-биологических наук (Ярилин А.А., 1996; Фильченков А.А., Стойка Р.С., 1999; Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В., 2002). Одними из основных регуляторов апоптоза в иммунной системе являются белки Bcl-2 и p53. Продукт гена bcl-2 – белок Bcl-2 имеет молекулярную массу 26 кД и является важнейшим репрессором апоптоза, который обладает двойным действием: может функционировать и как ионный канал, и как адапторный белок (Ярилин А.А., 2001). Он экспрессируется на мембране митохондрий, в меньшей степени – на ядерной мембране и на поверхности клеток (Барышников А.Ю., Шиш-

кин Ю.В., 2002; Zhang N. et al., 2005). Из клеток иммунной системы Bcl-2 экспрессируется на высоком уровне в незрелых предшественниках Т- и В-клеток, дубль-отрицательных спленоцитах, зрелых долгоживущих Т- и В-лимфоцитах, клетках памяти, слабая экспрессия или ее полное отсутствие наблюдается в период реаранжировки генов антигенраспознающих рецепторов, а также на эффекторных клетках (Orferman J., Korsmeyer S., 2003; Zhang N. et al., 2005). Особое место в регуляции апоптоза спленоцитов занимает белок p53. Показано, что повреждение ДНК способствует накоплению p53, который, в свою очередь, блокирует прогрессию клеточного цикла в фазе G1, препятствуя, таким образом, репликации ДНК до репарации повреждения. Если репарация повреждения невозможна, то белок p53 запускает механизм апоптоза.

В свою очередь, герминативные центры се-

лезенки сейчас рассматриваются в качестве своеобразных "чекпойнтов" в формировании В-клеточной толерантности (Orduño N.M. et al., 2009). В них происходит процесс созревания аффинности антител – клетки-продуценты низкоаффинных антител элиминируются апоптозом, тогда как продуценты высокоаффинных антител выживают благодаря интенсивной экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2. Нарушение этих процессов может вызвать продукцию антител, высокоаффинных к собственным антигенам, в частности, к панкреатическим. Следовательно, изучение особенностей апоптоза клеток селезенки может способствовать более глубокому пониманию иммунных нарушений, развивающихся при экспериментальном сахарном диабете (ЭСД).

Поэтому **целью** настоящего исследования было изучить экспрессию белков-регуляторов апоптоза в лимфоидных фолликулах селезенки крыс с ЭСД.

Материалы и методы

Исследования проведены на 48 самцах крыс линии Вистар массой 230-250 г (возраст 5-6 месяцев). ЭСД моделировали однократным внутрибрюшинным введением стрептозотоцина (SIGMA, США) в дозе 50 мг/кг. Крыс с ЭСД длительностью 28 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 белков Bcl-2 и p53 в лимфоидных фолликулах селезенки использовали иммуногистохимический метод непрямой иммунофлюоресценции. В качестве первичных антител использовали мышинные моноклональные антитела (МКАТ) к Bcl-2 крысы (mouse IgG1 isotype) производства Sigma Chemical (США) и кроличьи МКАТ к p53 крысы производства Santa Cruz Biotechnology (США), с которыми гистологические срезы инкубировали в течении 18 часов во влажной камере при $T=4^{\circ}\text{C}$. После отмывки избытка первичных антител в 0,1 М фосфатном буфере, срезы инкубировали 60 минут ($T=37^{\circ}\text{C}$) со вторичными антителами в разведении 1:64. В качестве вторичных антител использовали козы антитела к полной молекуле IgG мыши или 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 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. Все полученные экспериментальные данные обрабатывали на персональном компьютере пакетом прикладных и статистических программ VIDAS-2.5 (Kontron Elektronik, Германия), EXCEL из пакета MS Office 2007 (Microsoft Corp., США), пакета STATISTICA 6.0 (Stat-Soft, 2001).

Результаты и их обсуждение

Изучение серийных срезов селезенки контрольных крыс линии Wistar, предварительно инкубированных с моноклональными антителами к Bcl-2 показало, что в лимфоидных фолликулах селезенки среди Bcl-2⁺ клеток преобладают Bcl-2⁺-малые лимфоциты – на их долю приходится 38% от общего числа клеток, тогда как наименее представлены Bcl-2-средние лимфоциты – 15%. Развитие ЭСД (28 дней) сопровождалось увеличением количества Bcl-2⁺-клеток в лимфоидных фолликулах селезенки на 25% ($p<0,05$) по сравнению с контрольной группой животных. Изучение распределения отдельных классов и структуры популяции Bcl-2⁺-клеток показало увеличение плотности популяции и процентной доли Bcl-2⁺-малых лимфоцитов на 57% и 25% ($p<0,05$) соответственно, тогда как процентная доля Bcl-2⁺-лимфобластов уменьшалась на 28% ($p<0,05$) по сравнению с контрольной группой животных. Развитие ЭСД сопровождалось достоверным снижением концентрации белка Bcl-2 в Bcl-2⁺-клетках по сравнению с контролем (рис.1).

Развитие ЭСД (28 дней) сопровождалось увеличением количества p53⁺-клеток в лимфоидных фолликулах селезенки на 73% ($p<0,05$) по сравнению с контролем. 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. Развитие ЭСД (28 дней) сопровождалось достоверным снижением концентрации проапоптотического белка p53 в p53⁺-малых лимфоцитах и p53⁺-лимфобластах по сравнению с контролем (рис.2).

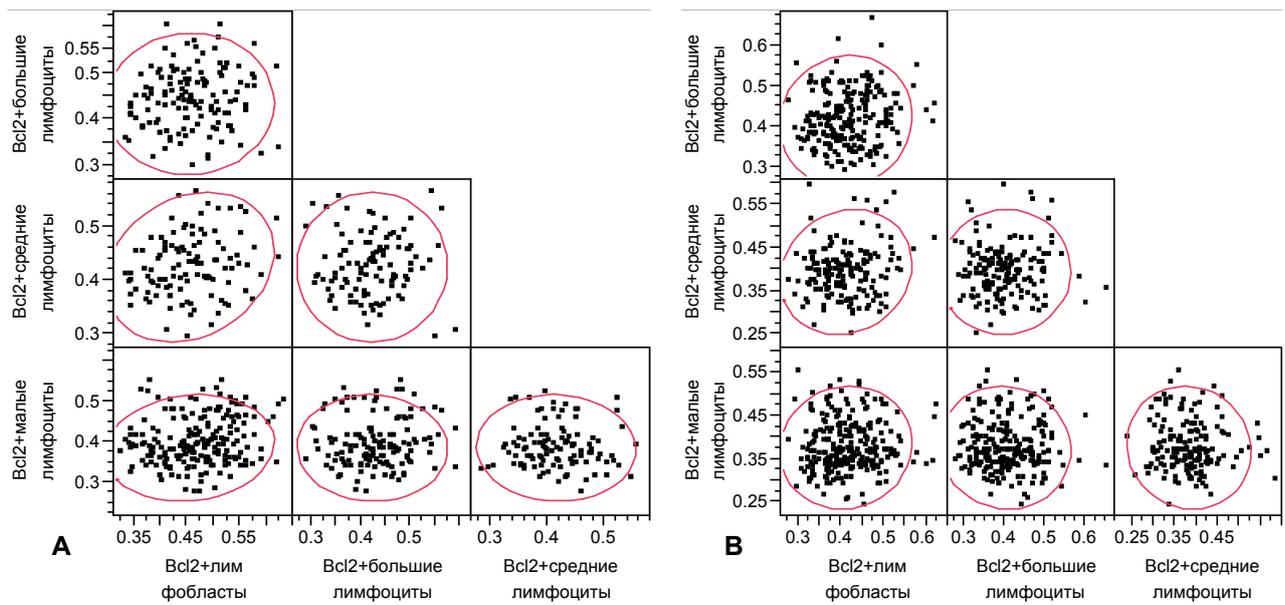


Рис. 1. Концентрация белка Bcl 2 ($E_{иф}$) в лимфоидных фолликулах селезенки у крыс линии Wistar (А-контроль, В-диабет 28 дней).

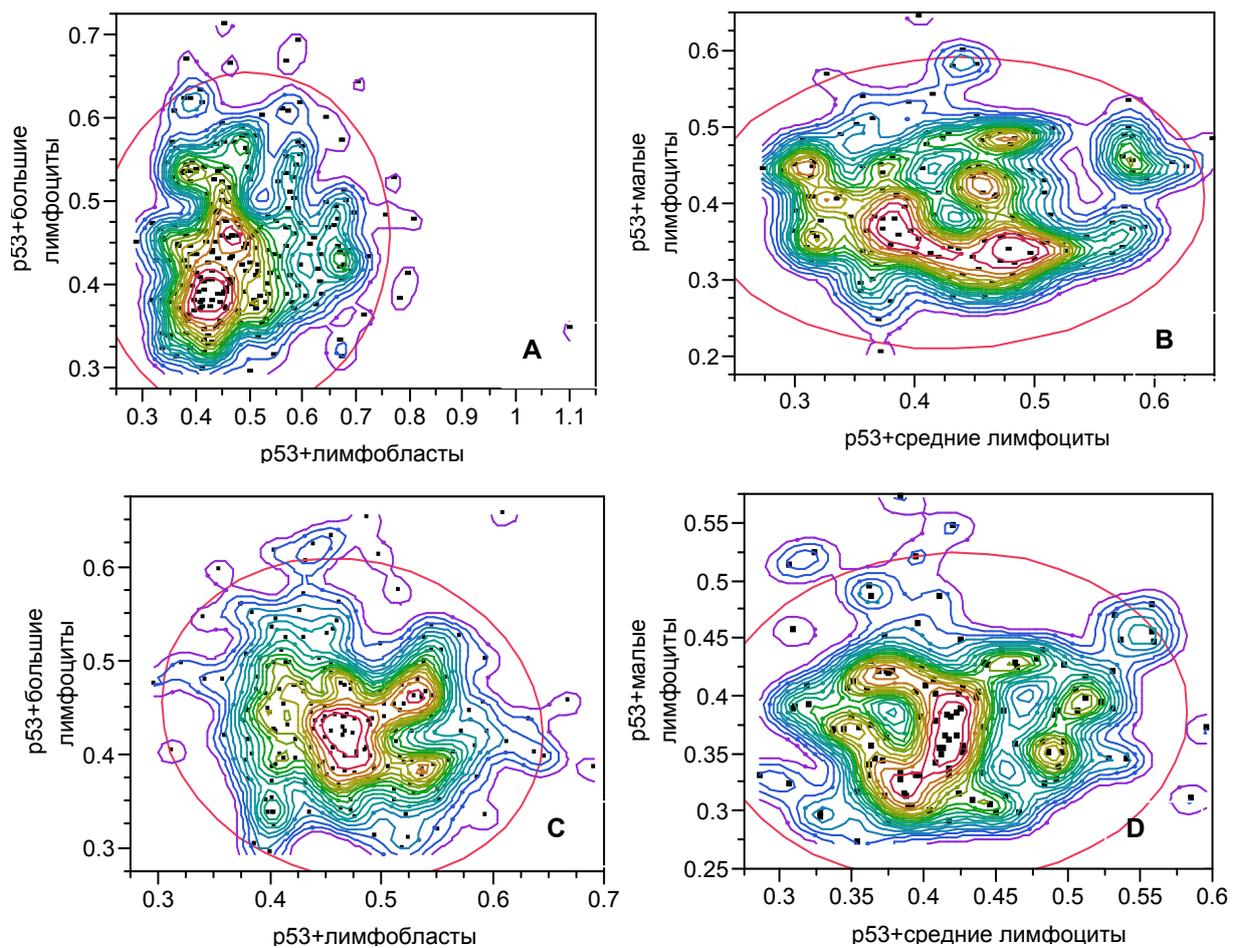


Рис. 2. Концентрация белка p53 ($E_{иф}$) в лимфоидных фолликулах селезенки у крыс линии Wistar (А-В – контроль, С-Д – диабет 28 дней).

Полученные результаты дают возможность предположить о наличии тесной связи между изменениями экспрессии Bcl-2, p53 и уровне апоптотических процессов в селезенке. Важную роль в регуляции Bcl-2-зависимого пути апоптоза играет взаимодействие с белком p53. Регуляция проницаемости митохондриальной мембраны осуществляется за счет баланса взаимодействующих белков семейства Bcl2, среди которых одни действуют в сторону понижения проницаемости митохондриальной мембраны (тот же Bcl2 и др.), а другие, про-апоптотические белки, наоборот, стимулируют выброс цитохрома С. Белок p53 влияет как на внешний, так и на митохондриальный пути индукции апоптоза (Harris S., Levine A., 2005; Lavin M., Gueven N., 2006; Levine A., et al., 2006). Действуя на митохондриальный путь, p53 репрессирует транскрипцию белка Bcl2 и активирует транскрипцию про-апоптотических белков Bax, Noxa, p53AIP1 и Puma (Oren M., 2003; Vousden K., 2006).

Несколько интригующе выглядит при развитии диабета одновременное увеличение клеток, экспрессирующих белки-регуляторы апоптоза с казалось бы противоположными функциями – проапоптотического белка p53 и антиапоптотического Bcl-2. Однако их взаимоотношения неправильно рассматривать и трактовать только в контексте парных взаимодействий – данный процесс является многофакторным и многоуровневым, в него активно вмешиваются и десятки других регуляторов апоптоза, в том числе и с транскрипционной активностью. Как это ни па-

радоксально, возможно даже допустить синергизм их действия в отношении регуляции запрограммированной клеточной смерти. Это подтверждается и недавними исследованиями R. Janicke с соавторами (2008), показавшими целый ряд антиапоптотических эффектов p53 в обзоре с красноречивым названием “The dark side of a tumor suppressor: anti-apoptotic p53” (Janicke R. et al., 2008). За последние несколько лет получены убедительные доказательства того, что p53 может затрагивать большое число сигнальных путей выживания, транскрипционным образом активизируя гены, продукты которых противодействуют апоптозу. Уже на сегодня известно около сорока мишеней p53, которые проявляют выраженный антиапоптотический потенциал, например транскрипционный фактор NF-kB.

Заключение

В целом, обнаруженные изменения экспрессии белков-регуляторов апоптоза Bcl-2 и p53 в лимфоидных фолликулах селезенки могут являться одним из факторов риска развития аутоиммунной патологии, так как вызывают дисбаланс про- и антиапоптотических стимулов и могут влиять на уровень выживания спленоцитов, продуцирующих высокоаффинные антитела к собственным антигенам, в том числе и к β -клеточным.

Перспективы дальнейших разработок связаны с изучением экспрессии различных маркеров апоптоза в лимфоидных фолликулах селезенки крыс с экспериментальным сахарным диабетом.

Литературные источники

Барышников А. Ю. Иммунологические проблемы апоптоза / А. Ю. Барышников, Ю. В. Шишкин. - М. : Эдиториал УРСС, 2002. – 320 с.

Фильченков А. А. Апоптоз и рак / А. А. Фильченков, Р. С. Стойка. - М. : Морион, 1999. – 184 с.

Ярилин А. А. Апоптоз и его место в иммунных процессах / А. А. Ярилин // Иммунология. - 1996. - № 6. – С. 10–22.

Ярилин А. А. Апоптоз: природа феномена и его роль в норме и при патологии / А. А. Ярилин // Актуальные проблемы патофизиологии. - М. : Медицина, 2001. - С. 13–56.

Harris S. The p53 pathway: positive and negative feedback loops / S. Harris, A. Levine // *Oncogene*. - 2005. - Vol. 24. - P. 2899–2908.

Jänicke R. The dark side of a tumor suppressor: anti-apoptotic p53 / R. Jänicke, D. Sohn, K. Schulze-Osthoff // *Cell Death Differ.* – 2008. – Vol. 15, № 6. – P. 959–976.

Lavin M. The complexity of p53 stabilization and activation / M. Lavin, N. Gueven // *Cell Death and Differentiation*. - 2006. - Vol. 13. - P. 941–950.

Levine A. The p53 pathway: what questions remain to be explored? / A. Levine, W. Hu, Z. Feng // *Cell Death and Differentiation*. - 2006. - Vol. 13. - P. 1027–1036.

Opferman J. Apoptosis in the development and maintenance of the immune system / J. Opferman, S. Korsmeyer // *Nat. Immunol.* – 2003. – Vol. 4. – P. 410–415.

Orduño N. M. B cells and immunological tolerance / Nataly Manjarrez Orduño, Tam Quach, Iñaki Sanz1 // *J. Invest. Dermatol.* – 2009. – Vol. 129, № 2. – P. 278–288.

Oren M. Decision making by p53: life, death and cancer / M. Oren // *Cell Death Differ.* - 2003. - Vol. 10. - P. 431–442.

Vousden K. Outcomes of p53 activation – spoiled for choice / K. Vousden // *J. Cell. Sci.* - 2006. - Vol. 119. - P. 5015–5020.

Zhang N. The role of apoptosis in the development and function of T lymphocytes / N. Zhang, H. Hartig, I. Dzhagalov [et al.] // *Cell Res.* – 2005. – № 10. – P. 749–769.

Гриневич І.В., Камишний А.М. Вплив експериментального цукрового діабету на експресію білків-регуляторів апоптозу p53 і bcl2 в лімфоїдних фолікулах селезінки.

Резюме. Проблема дослідження молекулярних механізмів апоптозу та його ролі у розвитку аутоімунних захворювань, в тому числі цукрового діабету, стала в останні роки однією з найбільш важких та актуальних проблем медико-біологічних наук. В експерименті досліджувався вплив експериментального цукрового діабету на інтенсивність експресії білків-регуляторів апоптозу Bcl-2 і p53 в селезінці щурів. Для виявлення Bcl-2 і p53-клітин використовувався імуногістохімічний метод непрямої імунофлюоресценції із застосуванням моноклональних антитіл до Bcl-2 і p53 щурів. Встановлено, що розвиток експериментального цукрового діабету супроводжується односпрямованою тенденцією щодо збільшення кількості p53- і Bcl-2 позитивних клітин в лімфоїдних фолікулах селезінки з переважним зниженням концентрації відповідних білків у імунопозитивних клітинах.

Ключові слова: селезінка, діабет, Bcl-2, p53.