

## ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА Bcl-2 В ТИМУСЕ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

*А.М.Камышный, Ю.М.Колесник, А.В.Абрамов, Н.А.Калиниченко*

*Кафедра патологической физиологии (зав. – проф. Ю.М.Колесник) Запорожского государственного медицинского университета*

**Резюме.** *Характеристика экспресии белка Bcl-2 у тимусе при экспериментальном цукровому діабеті.* Досліджували вплив експериментального цукрового діабету (ЕЦД) на інтенсивність експресії антиапоптотичного білка Bcl-2 в тимусі. Для визначення Bcl-2<sup>+</sup>-клітин застосували імуногістохімічний метод непрямої імунофлюоресценції з використанням моноклональних антитіл до Bcl-2 щура. Встановлено, що розвиток ЕЦД супроводжується гіперекспресією Bcl-2 в кірковому та мозковому шарі тимуса переважно за рахунок збільшення кількості Bcl-2<sup>+</sup>-великих, Bcl-2<sup>+</sup>-середніх та Bcl-2<sup>+</sup>-малих лімфоцитів.

**Ключові слова:** тимус, діабет, Bcl-2.

Исследование молекулярных механизмов апоптоза и его роли в развитии аутоиммунных заболеваний, в том числе и сахарного диабета, стало в последние годы одной из самых актуальных проблем [1]. Механизмы этого явления исследованы недостаточно, что связано прежде всего с огромным количеством регуляторов апоптоза [2]. Примером этого служат регуляторы апоптоза семейства Bcl-2, имеющего около 15 членов [3]. Его представители Bcl-2, Bcl-xL, bcl-2L1, BHRF1, LMW5-NL оказывают антиапоптотические эффекты; Bax, Bcl-xS, Bad, Bak и Bik усиливают апоптоз [4-5].

Продукт гена bcl-2 – белок Bcl-2 является важнейшим репрессором апоптоза, обладая двойной функцией – ионного канала и адапторного белка [6-7]. Он экспрессируется на мембране митохондрий, в меньшей степени – на ядерной и клеточной мембранах. Высокий уровень экспресии Bcl-2 касательно иммунной системы наблюдается в незрелых предшественниках Т- и В-клеток, дубль-отрицательных тимоцитах, зрелых долгоживущих Т- и В-лимфоцитах; слабая экспресия или ее отсутствие наблюдаются в период реаранжировки генов антигенраспознающих рецепторов, а также на эффекторных клетках [2, 7].

**Цель исследования.** Изучить экспресию белка Bcl-2 в тимусе (Тм) при эксперименталь-

ном сахарном диабете (ЭСД).

**Материал и методы.** Исследования проведены на 28 самцах крыс линии Вистар массой 230-250 г (возраст 5-6 мес.). Сахарный диабет моделировали однократным внутрибрюшинным введением стрептозотоцина (SIGMA, США) в дозе 50 мг/кг. Крыс с 3-недельным ЭСД декапитировали под наркозом, выделяли Тм, который фиксировали в растворе Буэна (18 час.) и после стандартной гистологической обработки заливали в парафин. Для выявления экспресии белка Bcl-2 в Тм использовали иммуногистохимический метод непрямої иммунофлюоресценции. В качестве первичных антител использовали мышинные моноклональные антитела к Bcl-2 крысы (mouse IgG1 isotype) (Sigma Chemical, США), с которыми гистологические срезы инкубировали в течение 18 час. во влажной камере при 4°С. После отмывки избытка первичных антител в 0,1М фосфатном буфере срезы инкубировали 60 мин. при 37°С со вторичными антителами в разведении 1:64, используя козьи антитела к полной молекуле IgG мыши, конъюгированные с FITC (Sigma Chemical, США). После инкубации срезы промывали 0,1М фосфатным буфером, заключали в смесь глицерина и фосфатного буфера (9:1) для последующей люминесцентной микроскопии. Исследовали корковое и мозговое вещество Тм, изображения которых с помощью видеокамеры СОНУ-4922 (США) вводили в систему цифрового анализа изображения VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Германия). Анализ структуры Тм проводили с помощью оригинального программного обеспечения, разработанного на основе мак-

роязыка программирования VIDAS [8-9]. Результаты обработаны статистически с использованием пакета прикладных и статистических программ VIDAS 2.5 (Kontron Elektronik, Германия).

**Результаты исследования и обсуждение.** Установлено, что количество Vcl-2<sup>+</sup>-клеток в мозговом веществе Тм у контрольных крыс на 29 % выше, чем в корковом. В структуре популяции Vcl-2<sup>+</sup>-клеток в корковом и мозговом веществе Тм в норме преобладают Vcl-2<sup>+</sup>-большие лимфоциты (35-36 %) тогда как наименее представлены Vcl-2<sup>+</sup>-недифференцированные клетки (таблица).

фобластов, тогда как процентная доля других классов Vcl-2<sup>+</sup>-клеток достоверно не изменялась. В мозговом веществе Тм у крыс с ЭСД наблюдалось снижение доли Vcl-2<sup>+</sup>-лимфобластов на 41 %, возрастание процентной доли Vcl-2<sup>+</sup>-средних лимфоцитов (на 43 %) и Vcl-2<sup>+</sup>-недифференцированных клеток (в 2,9 раза).

У млекопитающих описано три генеральных пути апоптоза: митохондриальный, липидный и через "рецепторы смерти" [10-11]. Во время эффекторной фазы митохондриального пути апоптоза, как правило, происходит увеличение концентрации Ca<sup>2+</sup> в цитоплазме. Основ-

**Таблица**  
**Количество Vcl-2<sup>+</sup>-клеток в тимусе крыс с экспериментальным сахарным диабетом (M±m)**

Группы животных	Суммарная плотность Vcl-2 <sup>+</sup> -клеток	Vcl-2 <sup>+</sup> -лимфобласты	Vcl-2 <sup>+</sup> -большие лимфоциты	Vcl-2 <sup>+</sup> -средние лимфоциты	Vcl-2 <sup>+</sup> -малые лимфоциты	Vcl-2 <sup>+</sup> -недифференцированные клетки
кора тимуса						
Контроль	418±23	<u>99±10</u> 23,8±2,5 %	<u>148±11</u> 35,3±2,7 %	<u>69±8</u> 16,6±1,9 %	<u>96±12</u> 23,1±2,9 %	<u>5±2</u> 1,2±0,5 %
Диабет (3 недели)	844±41*	<u>115±12</u> 13,6±1,5 %*	<u>311±20*</u> 36,8±2,3 %	<u>176±14*</u> 20,8±1,6 %	<u>239±21*</u> 28,3±2,5 %	<u>4±2</u> 0,5±0,1 %
мозговое вещество тимуса						
Контроль	541±32	<u>181±13</u> 33,4±2,5 %	<u>196±17</u> 36,2±3,2 %	<u>73±9</u> 13,6±1,7 %	<u>85±12</u> 15,8±2,2 %	<u>5±2</u> 0,9±0,2 %
Диабет (3 недели)	888±44*	<u>175±13</u> 19,7±1,5 %*	<u>351±20*</u> 39,5±2,3 %	<u>172±16*</u> 19,4±1,8 %*	<u>167±14*</u> 18,8±1,6 %	<u>23±5*</u> 2,6±0,6 %*

Примечание: в числителе - плотность Vcl-2<sup>+</sup>-клеток на 1 мм<sup>2</sup> тимуса, в знаменателе – процентная доля отдельных классов Vcl-2<sup>+</sup>-клеток ; \* – достоверность отличий параметров (p<0,05) по отношению к контролю.

Развитие ЭСД сопровождается достоверным возрастанием суммарной плотности Vcl-2<sup>+</sup>-клеток в коре Тм в 2 раза и в мозговом веществе – на 64 %. В корковом веществе Тм увеличение плотности Vcl-2<sup>+</sup>-клеток обусловлено значительным возрастанием количества Vcl-2<sup>+</sup>-больших (в 2,1 раза), Vcl-2<sup>+</sup>-средних (в 2,5 раза) и Vcl-2<sup>+</sup>-малых лимфоцитов (в 2,4 раза), а в мозговом веществе, помимо вышеназванных классов Vcl-2<sup>+</sup>-клеток, достоверно увеличивается и количество Vcl-2<sup>+</sup>-недифференцированных клеток.

Изучение структуры популяции Vcl-2<sup>+</sup>-клеток в корковом веществе Тм у крыс с ЭСД показало снижение на 43 % доли Vcl-2<sup>+</sup>-лим-

ными источниками префицита кальциевых ионов в клетке служат межклеточные пространства, матрикс митохондрий и эндоплазматический ретикулум. Увеличение содержания Ca<sup>2+</sup> в цитозоле ведет к активации эндонуклеаз, тканевой трансглутаминазы и клеточных протеаз, участвующих в деградиционной фазе [6]. Митохондриальный путь является Vcl-2-зависимым [12]. На внешней мембране митохондрий постоянно презентировано большое количество Vcl-2. Этот протеин и его гомологи (Vcl-x1, Mcl-1 и др.) выполняют функцию защиты клеток от апоптоза, поддерживая проапоптотический белковый комплекс в инактивированном состоянии. В его состав входят прокаспаза-9 (Araf-3), адап-

тер Araf-1, флавопротеин AIF, цитохром с Araf-2, фактор Smac и другие менее изученные факторы [4]. Среди белков Bcl-2 семейства существует также группа апоптоз-опосредующих факторов (например, Вах, Vad, Vak, Bik, Bid, Bcl-xs и др.) [3]. Для переключения клетки в режим апоптоза необходимо связывание Bcl-2, что нейтрализует ингибирующее действие последнего. Оно может осуществляться любым из проапоптотических факторов Bcl-2-семейства. При этом компоненты из ранее заблокированного комплекса освобождаются и свободно выходят в цитоплазму через дезорганизованную и достаточно перфорированную мембрану митохондрии. В присутствии АТФ и цитохрома белок Araf-1 олигомеризуется (часто до октамера) и повторно связывается с прокаспазой-9 по специфическому каспаз-связывающему (CARD) домену. Каспаза-9, в свою очередь, активирует каспазу-3, являющейся эффекторной цистеиновой протеиназой [13]. Во-первых, она активирует другие эффекторные каспазы (например, каспазу-6 и -7), а во-вторых, вызывает протеолиз различных субстратов. Цистеиновые протеиназы инактивируют белки, защищающие клетку от апоптоза (например, Bcl-2), расщепляют структурные белки (например, актин, ламинин, плектин, виментин и фодрин), нарушают работу киназных, полимеразных и других ферментных систем, инициируют фрагментацию ДНК путем активации ДНКаз, уничтожают сигнальные системы клетки [13]. Высвобождение фактора AIF под действием антагониста Bcl-2 также ведет к стимуляции каскада активации протеаз через каспазу-3 [6]. Кроме того, AIF способен нарушать работу ядерного аппарата, вызывая конденсацию хроматина и фрагментацию ДНК. Фактор Smac инактивирует ингибиторы апоптоза из семейства IAP-белков.

Существует еще несколько механизмов, приводящих к апоптозу через ингибирование Bcl-2. Например, возможна регуляция через онко-супрессор – белок p53, замедляющий в нормальных клетках пролиферативную активность [14].

Полученные данные можно трактовать как развитие гиперэкспрессии Bcl-2 в результате ЭСД, что не противоречит известным данным, свидетельствующих о связи повышения экспрессии Bcl-2 и развития аутоиммунных про-

цессов [1]. Моделирование ослабления апоптоза путем трансфекции мышам гена bcl-2 в форме, предусматривающей его спонтанную экспрессию во всех или в определенных клетках, показало, что основное последствие гиперэкспрессии Bcl-2 состоит в развитии системных аутоиммунных процессов (системной красной волчанки, ревматоидного артрита), а также в накоплении необычных клеток Т-ряда с фенотипом CD3-TCR $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup>- CD8<sup>-</sup> B220<sup>+</sup> (лишенных корецепторов и несущих маркер В-клеток B220), в норме обнаруживаемых в ограниченном количестве лишь в некоторых органах (в печени).

Таким образом, усиление экспрессии Bcl-2 в Тм у крыс с ЭСД оказывает значительное влияние на характер течения процессов апоптоза, что может отразиться на характере позитивной и негативной селекции тимоцитов и формировании центральной толерантности к антигенам панкреатических островков. Гиперэкспрессия Bcl-2 в Тм при ЭСД, на наш взгляд, может быть одним из ключевых факторов, способствующих развитию тимической дисфункции и объясняющих иммунные механизмы патогенеза развития сахарного диабета.

**Выводы.** 1. Количество Bcl-2<sup>+</sup>-клеток в мозговом веществе тимуса интактных крыс на 29 % выше, чем в корковом. В структуре популяции Bcl-2<sup>+</sup>-клеток в норме преобладают Bcl-2<sup>+</sup>-большие лимфоциты, наименее представлены Bcl-2<sup>+</sup>-недифференцированные клетки. 2. Развитие экспериментального сахарного диабета сопровождается возрастанием суммарной плотности Bcl-2<sup>+</sup>-клеток в коре тимуса в 2 раза и в мозговом веществе – на 64 % преимущественно за счет увеличения количества Bcl-2<sup>+</sup>-больших, Bcl-2<sup>+</sup>-средних и Bcl-2<sup>+</sup>-малых лимфоцитов. В структуре популяции Bcl-2<sup>+</sup>-клеток наблюдается снижение доли Bcl-2<sup>+</sup>-лимфобластов в корковом и мозговом веществе тимуса, возрастание доли Bcl-2<sup>+</sup>-средних лимфоцитов и Bcl-2<sup>+</sup>-недифференцированных клеток в мозговом веществе тимуса.

**Перспективы дальнейших исследований.** Представленные исследования свидетельствуют о перспективности поисков средств коррекции иммунных дисфункций при сахарном диабете.

## Литература

1. Rietz C., Screpanti V., Brenden N. Overexpression of *bcl-2* in T cells affects insulinitis in the nonobese diabetic mouse // *Scand. J. Immunol.* – 2003. – V. 57. – № 4. – P. 342-349.
2. Marsden V., Strasser A. Control of apoptosis in the immune system: *Bcl-2*, *BH3*-only proteins and more // *Annu. Rev. Immunol.* – 2003. – V. 21. – P. 71-105.
3. Hughes P., Bouillet P., Strasser A. Role of *Bim* and other *Bcl-2* family members in autoimmune and degenerative diseases // *Curr. Dir. Autoimmun.* – 2006. – V. 9. – P. 74-94.
4. Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В. Иммунологические проблемы апоптоза. – М.: Эдиториал УРСС, 2002. – 320 с.
5. Huthcheson J., Scatizzi J., Bickel E. et al. Combined loss of proapoptotic genes *Bak* or *Bax* with *Bim* synergizes to cause defects in hematopoiesis and in thymocyte apoptosis // *JEM.* – 2005. – V. 201, № 12. – P. 1949-1960.
6. Ferri K., Kroemer G. Control of apoptotic DNA degradation // *Nat. Cell Biol.* – 2000. – V. 2. – P. 63-64.
7. Langenau D., Jette C. Suppression of apoptosis by *bcl-2* overexpression in lymphoid cells of transgenic zebrafish // *Blood.* – 2005. – V. 105, № 8. – P. 3278-3285.
8. Абрамов А.В., Камышин А.М., Колесник Ю.М., Любомирская В.А. Структурно-функциональна організація лимфоїдної популяції тимуса: опыт применения математического классификационного анализа // *Клінічна та експериментальна патологія.* – 2002. – № 1. – С. 5-9.
9. Абрамов А.В., Колесник Ю.М., Любомирська В.А., Камышин О.М. Алгоритм автоматичного аналізу лимфоїдної популяції тимуса // *Вісник морфології.* – 2002. – № 2. – С. 261-262.
10. Chung H., Choi I., Ko M., Seong R. Rescuing Developing Thymocytes from Death by Neglect // *J. of Biochemistry and Molecular Biology.* – 2002. – V. 35. – № 1. – P. 7-18.
11. Zhang N., Hartig H., Dzhagalov I. et al. The role of apoptosis in the development and function of T lymphocytes // *Cell Res.* – 2005. – № 10. – P. 749-769.
12. Domen J., Cheshier S., Weissman I. The role of apoptosis in the regulation of hematopoietic stem cells: overexpression of *Bcl-2* increases both their number and repopulation potential // *J. Exp. Med.* – 2000. – V. 191. – P. 253-264.
13. Nagata S. Apoptotic DNA fragmentation // *Exp. Cell Res.* – 2000. – V. 256. – P. 12-18.
14. Chipuk J., Green D. Dissecting *p53*-dependent apoptosis // *Cell Death and Differentiation.* – 2006. – V. 13. – P. 994-1002.

#### ХАРАКТЕРИСТИКА ЕКСПРЕССИИ БЕЛКА BCL-2 В ТИМУСЕ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

А.М.Камышин, Ю.М.Колесник, А.В.Абрамов,  
Н.А.Калиниченко

**Резюме.** В эксперименте исследовали влияние экспериментального сахарного диабета (ЭСД) на интенсивность экспрессии антиапоптотического белка *Bcl-2* в тимусе. Для выявления *Bcl-2*<sup>+</sup>-клеток использовали иммуногистохимический метод непрямой иммунофлюоресценции с применением моноклональных антител к *Bcl-2* крысы. Установлено, что развитие ЭСД сопровождается гиперэкспрессией *Bcl-2* как в корковом, так и в мозговом веществе тимуса преимущественно за счет увеличения количества *Bcl-2*<sup>+</sup>-больших, *Bcl-2*<sup>+</sup>-средних и *Bcl-2*<sup>+</sup>-малых лимфоцитов.

**Ключевые слова:** тимус, диабет, *Bcl-2*.

#### CHARACTERISTIC OF PROTEIN BCL-2 EXPRESSION IN THE THYMUS IN EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS

А.М.Камышныи, Ю.М.Колеснык, А.В.Абрамов,  
Н.А.Калиниченко

**Abstract.** The effect of experimental diabetes mellitus (EDM) on the intensity of thymic antiapoptotic protein *Bcl-2* expression was investigated. In order to evaluate *Bcl-2*<sup>+</sup>-cells the immunohistochemical method of indirect immunofluorescence employing monoclonal antibodies to rat *Bcl-2* was used. It has been established that the development of EDM is accompanied with *Bcl-2* hyperexpression in the cortical and medullary substance of the thymus, mainly at the expense of an increase of the number of *Bcl-2*<sup>+</sup>-big, *Bcl-2*<sup>+</sup>-average and *Bcl-2*<sup>+</sup>-small lymphocytes.

**Key words:** thymus, diabetes, *Bcl-2*.

State Medical University (Zaporizhia)

Надійшла 29.01.2007 р.  
Рецензент – проф. І.С.Давиденко (Чернівці)