

ПЕПТИД ЭПИФИЗА ВОССТАНАВЛИВАЕТ ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ИНДУЦИРОВАННОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

В.Х. Хавинсон
Н.С. Линькова
А.В. Трофимов
А.В. Дудков

Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН

e-mail: miauy@yandex.ru

В модели индуцированного сахарного диабета на крысах показано, что данное заболевание характеризуется выраженными морфофункциональными изменениями поджелудочной железы. Синтетический пептид эпифиза эпیتالон восстанавливает гормонообразующую функцию поджелудочной железы при сахарном диабете и способствует регенерации А- и В-клеток, что выражается в усилении их пролиферативной активности и снижении апоптоза. Полученные данные свидетельствуют о регуляторной роли эпифиза как центрального органа нейроиммунноэндокринной системы в отношении поджелудочной железы.

Ключевые слова: пептид эпифиза, поджелудочная железа, сахарный диабет.

В последние десятилетия наблюдается значительное увеличение заболеваемости сахарным диабетом в мире [1, 2, 7]. Показано, что в экономически развитых странах сахарным диабетом страдают до 10% населения [2, 3]. Увеличение распространенности заболеваемости сахарным диабетом в первую очередь наблюдается среди лиц старше 40 лет, при этом каждые 15 лет заболеваемость сахарным диабетом удваивается [2].

Негативное влияние патологических состояний поджелудочной железы на качество жизни обуславливает необходимость поиска новых эффективных и безопасных средств для профилактики и лечения патологических изменений в поджелудочной железе при сахарном диабете.

Известно, что поджелудочная железа является эндокринным органом, пептидергическая регуляция функций которого осуществляется центральным органом нейроиммунноэндокринной системы – эпифизом [4-6, 13]. В Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии был синтезирован пептид эпифиза эпیتالон, обладающий геропротекторным, онкостатическим, иммуномодулирующим и рядом других биологических эффектов, выявленных как на генном и молекулярном уровнях, так и на уровне органов и тканей [8-12].

В связи с этим **целью работы** явилось изучение влияния пептида эпифиза на морфофункциональное состояние поджелудочной железы при индуцированном сахарном диабете.

Методика. Исследование проводили на 28 самцах крыс линии Вистар в возрасте 3 месяцев с массой тела 150-250 г. Животных разделили на 4 равные группы.

1 (контрольную) группу составили интактные животные. Крысам 2 и 3 групп внутрибрюшинно однократно вводили стрептозотонин (Sigma, США) из расчета 50 мг/кг массы тела животного в 0,5 мл 0,1М цитратного буфера (рН 4,5). Стрептозотонин является противоопухолевым веществом, которое вызывает деструкцию В-клеток поджелудочной железы, в результате чего синтез инсулина в них уменьшается. Через 2-3 недели после введения стрептозотонина у экспериментальных животных развивался сахарный диабет. Животным 3 группы внутримышечно в дозе 100 мкг ежедневно в течение первых 10 суток после введения стрептозотонина вводили синтетический пептид эпифиза эпیتالон (Н-Ala-Glu-Asp-Gly-OH) [11].

Кусочки поджелудочной железы крыс контрольной и подопытных групп забирали через 20 суток после воздействия стрептозотонина и через 10 суток после окончания введения эпیتالона, фиксировали в 10% нейтральном формалине, обезжовивали и заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм помещали на предметные стекла, покрытые пленкой из поли-L-лизина (Sigma, США).

Иммуногистохимические исследования А- и В-клеток островков поджелудочной железы выполнены с использованием моноклональных антител к инсулину (Dako,



1:50) и глюкагону (Dako, 1:75). Для изучения баланса между пролиферативной активностью и апоптозом в ацинарной ткани использовали моноклональные антитела к ядерному антигену пролиферирующих клеток (PCNA – proliferative cell nuclear antigen, clone PC10, Dako, титр 1:300) и проапоптотическому белку p53 (Dako, титр 1:50). Иммуноокрашивание идентифицировали авидин-биотин комплексным методом с использованием набора для визуализации Universal ABC kit (Dako).

Морфометрическое исследование проводили с использованием системы компьютерного анализа микроскопических изображений, состоящей из микроскопа Nikon Eclipse E400, цифровой камеры Nikon DXM 1200, персонального компьютера на базе Intel Pentium 4 и программного обеспечения «Видеотест-Морфология 5.0».

В каждом случае анализировали 10 полей зрения при увеличении 400. Площадь экспрессии рассчитывали как отношение площади, занимаемой иммунопозитивными клетками, к общей площади клеток в поле зрения и выражали в процентах. Для оценки межгрупповых различий применяли t-критерий Стьюдента.

Результаты. 1 группа (контроль). При иммуногистохимическом исследовании поджелудочной железы интактных животных было установлено, что площадь экспрессии инсулин-продуцирующих В-клеток составила $9,78 \pm 0,43\%$, глюкагон-продуцирующих А-клеток – $3,43 \pm 0,42\%$. (таблица, рисунок, А).

Таблица

**Экспрессия иммуногистохимических маркеров
в поджелудочной железе крыс**

Группа животных	Площадь экспрессии, %			
	инсулин	глюкагон	PCNA	p53
1 группа (контроль)	$9,78 \pm 0,43$	$3,43 \pm 0,42$	$1,92 \pm 0,35$	$0,58 \pm 0,09$
2 группа (стрептозотонин)	$2,42 \pm 0,78^*$	$6,24 \pm 0,32^*$	$5,59 \pm 1,41^*$	$4,53 \pm 1,03^*$
3 группа (стрептозотонин + эпиталон)	$6,43 \pm 0,35^{**}$	$4,67 \pm 0,56^{**}$	$2,80 \pm 0,64^{**}$	$1,27 \pm 0,12^{**}$

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с 1 группой,

** – $p < 0,05$ по сравнению со 2 группой.

В ацинарной ткани поджелудочной железы наблюдался следующий баланс между пролиферирующими экзокриноцитами и клетками, вступившими в апоптоз: Площадь экспрессии маркера пролиферации PCNA составила $1,92 \pm 0,55\%$, а апоптотического маркера p53 $0,58 \pm 0,43\%$ (таблица), что свидетельствует о преобладании процессов пролиферации над клеточной гибелью.

2 группа (введение стрептозотонина). В модели индуцированного стрептозотонином сахарного диабета площадь экспрессии инсулина В-клетками достоверно снижалась в 3.5 раза относительно контроля (табл. 1, рисунок, Б), в то время как площадь экспрессии глюкагон-продуцирующих А-клеток возрастала в 2 раза (таблица).

Площадь экспрессии маркера пролиферации PCNA и проапоптотического белка p53 возрастала соответственно в 2.5 и 8 раз по сравнению с контролем (таблица).

Таким образом, в модели индуцированного сахарного диабета наблюдалось компенсаторное усиление продукции гормонов поджелудочной железы на фоне усиления клеточной гибели.

3 группа (введение стрептозотонина и эпиталона). Применение эпиталона после введения стрептозотонина оказывает выраженное компенсаторное действие на ткань поджелудочной железы, улучшая показатели морфофункциональной активно-

сти как островкового аппарата, так и экзокринной части поджелудочной железы, нарушенные в условиях индуцированного сахарного диабета.

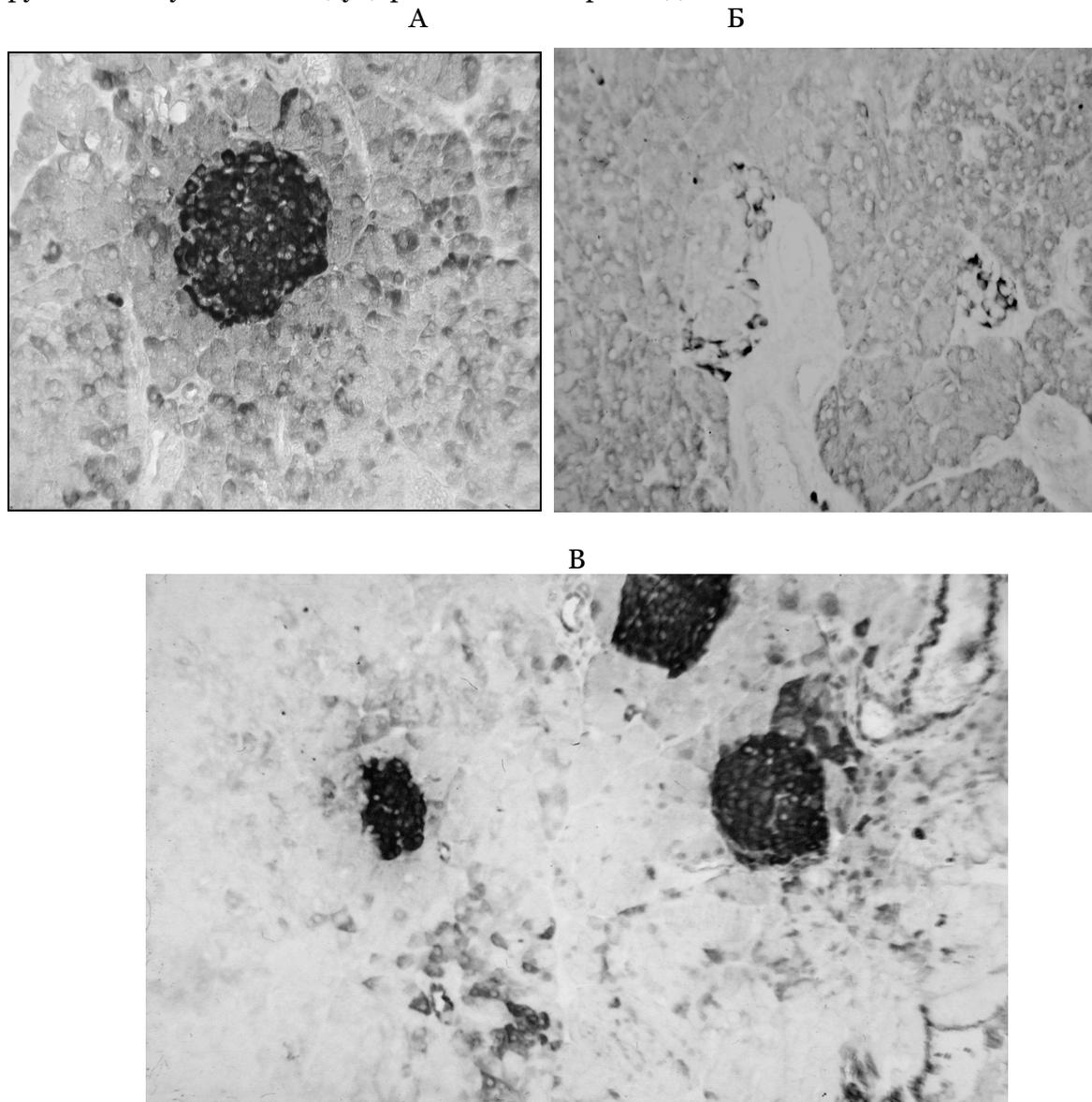


Рис. 1. Островок Лангерганса в поджелудочной железе крысы. Иммуногистохимическая реакция с антителами к инсулину, х400: А – 1 группа (контроль), Б – 2 группа (стрептозотоцин), В – 3 группа (стрептозотоцин + эпиталон)

Эпиталон способствовал достоверно увеличению площади экспрессии инсулина В-клетками в 2.3 раза и снижению площади экспрессии глюкогона в 1.4 раза по сравнению со 2 группой (таблица). Следует отметить, что под влиянием эпиталона продукция глюкогона в ткани поджелудочной железы в модели индуцированного сахарного диабета восстанавливалась до уровня контроля. Кроме того, под действием эпиталона экспрессия проапоптотического белка р53 снижалась в 4 раза по сравнению со 2 группой, а пролиферативная активность соответствовала контрольному уровню (таблица).

Заключение. В модели индуцированного сахарного диабета на крысах в поджелудочной железе развиваются выраженные морфофункциональные изменения, связанные со снижением синтеза инсулина В-клетками, усилением секреции глюкогона А-клетками и смещением процессов клеточного обновления в сторону усиления апоптоза.



Синтетический пептид эпифиза эпиталон способствует восстановлению структуры и эндокринной функции поджелудочной железы в модели индуцированного сахарного диабета. Под влиянием эпиталона наблюдалась нормализация синтеза глюкогона и восстановление пролиферативной активности клеток поджелудочной железы и приближение экспрессии инсулина и проапоптотического белка к контрольным значениям.

Полученные данные показали, что эпифиз как центральный орган нейроиммунноэндокринной системы играет важную роль в пептидной регуляции морфофункционального состояния поджелудочной железы и способствует восстановлению ее активности при индуцированном сахарном диабете.

Литература

1. Балаболкин, М.И. Сахарный диабет / М.И. Балаболкин. – М.: Медицина, 1994. – 383 с.
2. Дедов, И.И. Патогенез сахарного диабета / И.И. Дедов, М.И. Балаболкин // Мед. акад. журн. – 2006. – Т. 6. – № 3. – С. 3-15.
3. Гончарова, Н.Д. Пептидная коррекция возрастных нарушений гормональной функции поджелудочной железы у обезьян / Н.Д. Гончарова (и др.) // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2004. – Т. 138. – № 7. – С. 94-97.
4. Коркушко, О.В. Пинеальная железа: пути коррекции при старении / О.В. Коркушко, В.Х. Хавинсон, В.Б. Шатило. – СПб.: Наука, 2006. – 204 с.
5. Линькова, Н.С. Влияние пептидов эпифиза на функции тимуса при его старении / Н.С. Линькова (и др.) // Усп. геронтол. – 2010. – Т. 23. – № 4. – С. 543-546.
6. Полякова, В.О. Динамика процессов апоптоза и пролиферации клеток пинеальной железы человека при старении / В.О. Полякова, Н.С. Линькова, С.А. Пичугин // Бюлл. эксп. биол. мед. – 2010. – Т. 150. – № 10. – С. 443-445.
7. Хавинсон, В.Х. Применение эпиталамина при инсулиннезависимом сахарном диабете / В.Х. Хавинсон, Т.С. Шутак. – СПб.: Фолиант. – 2000. – 80 с.
8. Хавинсон, В.Х. Пептидная регуляция старения: 35-летний опыт исследований / В.Х. Хавинсон, В.Н. Анисимов // Бюлл. эксп. биол. и мед. – 2009. – Т. 148. – № 7. – С. 108-113.
9. Хавинсон, В.Х. Пептидная регуляция старения / В.Х. Хавинсон. – СПб.: Наука, 2009. – 50 с.
10. Anisimov, V.N. Peptide bioregulation of aging: results and prospects / V.N. Anisimov, V.Kh. Khavinson // Biogerontology. – 2010. – Vol. 11. – P. 139-149.
11. Khavinson, V.Kh. Tetrapeptide revealing geroprotective effect, pharmacological substance on its basis, and the method of its application. USA patent N US № 6,727,227. 2004.
12. Khavinson, V.Kh. Gerontological aspects of genome peptide regulation / V.Kh. Khavinson, V.V. Malinin // Basel (Switzerland): Karger AG. – 2005. – 104 p.
13. Tohno, Y. Age-related changes of elements and relationships among elements in the common bile and pancreatic ducts / Y. Tohno, T. Setsuko // Biolog. Trace Element Research. – 2004. – Vol. 101. – N 1. – P. 47-60.

THE EPIPHYSIS PEPTIDE RESTORE FUNCTIONAL ACTIVITY OF PANCREAS IN INDUCED DIABETTUS MELLITUS

V. Kh. Khavinson
N. S. Linkova
A.V. Trofimov
A.V. Dudkov

*St. Petersburg Institute
of Bioregulation and Gerontology,
NMB of RAMS*

e-mail: miayy@yandex.ru

In the model of induced pancreatic diabetes has been demonstrated that this disease is characterized significant morphofunctional changes of pancreas. The synthetic peptide of epiphysis, epitalon, restore hormonal function of pancreas, induce proliferation activity and decrease of apoptosis of A- and B-cells of pancreas. These data demonstrate, that pineal gland as the main organ of neuroimmunoendocrine system, play important role of peptide regulation of pancreas.

Keywords: peptide of pineal gland, pancreas, pancreatic diabetes.