

В.В. Рушак, М.О. Чашин

Зміни вмісту інсуліну в підшлунковій залозі морських свинок при метаболічному синдромі

Одним з інтегральних показників стану організму при моделюванні метаболічного синдрому у морських свинок є рівень продукції інсуліну. Порівняння цього показника з концентрацією глюкози в крові може характеризувати ступінь резистентності клітин до інсуліну. В цій роботі визначали вміст інсуліну в клітинах підшлункової залози морських свинок у нормі та при метаболічному синдромі. Результати порівнювали з показниками вмісту глюкози в крові дослідних тварин. Використано методи гістохімічного та імуногістохімічного аналізу продукції інсуліну. Було встановлено, що розвиток метаболічного синдрому у морських свинок супроводжується порушеннями синтезу інсуліну, дистрофічними змінами в тканині підшлункової залози та збільшенням концентрації глюкози в крові. Отримані результати дають змогу говорити про наявність у дослідних тварин інсулінорезистентності, яка є основним патогенетичним механізмом у розвитку метаболічного синдрому.

Ключові слова: імуногістохімія, підшлункова залоза, морські свинки, інсулін, метаболічний синдром.

ВСТУП

Метаболічний синдром – комплекс метаболічних і гормональних порушень, які розвиваються внаслідок інсулінорезистентності та компенсаторної гіперінсулінемії [1]. Згідно з даними літератури, до появи інсулінорезистентності у більшості випадків призводить ожиріння. Надлишок жирової тканини в абдомінальній зоні та супутні цьому нейрогормональні порушення відіграють важливу роль у розвитку інсулінорезистентності та пов'язаних з нею метаболічних розладів. Збільшення об'єму жирових клітин супроводжується зменшенням щільності інсулінових рецепторів на їх поверхні та зниженням їх чутливості до інсуліну [2]. Це в свою чергу призводить до активного ліполізу, що викликає накопичення вільних жирних кислот і гліцерину, які через кров у великих кількостях надходять у печінку та скелетні м'язи. Локальне накопичення метаболітів вільних жирних кислот (таких, як церамід, диаліцерол, ацил КоА) та посилений синтез адипоцитами протизапальних цитокінів (се-

ред яких фактор некрозу пухлин α (ФНП- α) та інтерлейкін (ІЛ-6)) порушують передачу інсулінового сигналу знижуючи активність тирозинкінази інсулінового рецептора [3, 4]. Подальше зменшення зв'язування клітинами інсуліну та розвиток гіперінсулінемії порушує вуглеводний обмін, що в свою чергу сприяє розвитку периферичної інсулінорезистентності та гіперглікемії [5, 6].

Здатність β -клітин підшлункової залози реагувати на підвищений вміст глюкози у крові посиленою секрецією інсуліну допомагає нормалізувати концентрацію глюкози. Однак постійна стимуляція β -клітин високим вмістом глюкози та їх чутливість до підвищеної концентрації вільних жирних кислот (феномен ліпотоксичності) сприяють виснаженню β -клітин і розвитку їх секреторної дисфункції. При цьому кількість функціонально активних β -клітин знижується, що компенсується посиленням синтезом в них інсуліну. Це призводить до виснаження та деструкції β -клітин, а з часом – до розвитку цукрового діабету 2-го типу та супутніх йому ускладнень [7].

© В.В. Рушак, М.О. Чашин

Морські свинки (*Cavia porcellus*) є одним із модельних об'єктів, ця експериментальна модель є зручною для вивчення патологічних процесів, пов'язаних з вільнорадикальним ураженням, зокрема метаболічного синдрому та цукрового діабету і дає змогу отримати результати з найбільшою ймовірністю екстраполювати на людський організм.

Проте дослідження метаболічного синдрому з використанням морських свинок ускладнюються конститутивно низьким вмістом інсуліну у молодих тварин (в 5 разів менше, ніж у дорослих) [8]. Визначення цього білка в сироватці крові за допомогою імуноферментного аналізу потребує специфічних для цього виду тварин антитіл, оскільки інсулін морських свинок суттєво відрізняється від інсуліну інших видів [9–11].

Метою нашої роботи було вивчення патологічних процесів у підшлунковій залозі морських свинок під час моделювання у них метаболічного синдрому.

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на 10 чотиримісячних самцях морських свинок із середньою масою 370 г, які були поділені на дві групи – контрольну та експериментальну. Контрольних тварин утримували за стандартних умов 12-годинного світлового режиму та вільного доступу до води і їжі. Розвиток метаболічного синдрому викликали внутрішньом'язовим введенням 15 мг/кг протаміну сульфату двічі на добу впродовж 5 тиж, з наступним утриманням тварин за нормальних умов протягом 2 тиж [12]. На 49-ту добу тварин декапітували. Всі експерименти на тваринах проводили з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей.

Забір крові проводили за допомогою проколу вени вушної раковини. Вміст глюкози вимірювали за допомогою глюкометра Акку-Чек Актив ("Акку-Чек"®, Німеччина).

В нашій роботі досліджували вміст інсуліну в підшлунковій залозі тварин за допомогою гістохімічного та імуногістохімічного методів.

Вміст інсуліну визначали в парафінових зрізах тканин підшлункової залози морських свинок, які виготовляли згідно зі стандартним методом [13]. Парафінові зрізи товщиною 4–6 мкм фіксували на скельцях з адгезивними властивостями ("SuperFrostPlus", Німеччина) або на скельцях, вкритих полі-L-лізином. У першому випадку зрізи залишали на 30 хв при 56°C, в другому – на добу при 37°C.

Забарвлення альдегід-фуксином здійснювали за методом Гоморі [13]. Препарати витримували у 0,5%-му розчині йоду та знебарвлювали 0,5%-м розчином гідросульфиту натрію. Після промивання у воді зрізи зневоднювали у 70%-му спирті. Після цього препарати забарвлювали альдегід-фуксином, промивали у декількох об'ємах 70%-го спирту та дофарбовували гематоксиліном ядра для візуалізації клітин.

Імуногістохімічний аналіз проводили згідно зі стандартним протоколом [14]. У день проведення реакції зрізи депарафінували та гідратували. Для оптимального імуногістохімічного визначення вмісту інсуліну антиген демаскували обробкою зрізів в мікрохвильовій печі в розчині цитратного буфера (pH 6,0). Скельця зі зрізами охолоджували протягом 20 хв при кімнатній температурі і промивали у розчині PBS (від англ. Phosphate buffered saline), після чого інкубували у 3%-му розчині пероксидази хрину впродовж 10 хв. Після відмивання препаратів для зменшення неспецифічного забарвлення на зрізи наносили 1%-й розчин бичачого сироваткового альбуміну (BCA). Інкубацію зрізів з первинними моноклональними мишачими антитілами проти інсуліну (CE9H9, "Millipore", США) проводили протягом однієї години в оптимальному розведенні (1:300), після чого зрізи тричі відмивали від нез'язаних первинних антитіл у PBS. Далі скельця зі зрізами інкубували 45 хв з вторинними

антитілами системи PolyVueHRP Detection System (“DiagnosticBioSystems”, США) та тричі відмивали у PBS. Для візуалізації пероксидази проводили кольорову реакцію з використанням хромоген-3-діамінобензидину тетраклориду (DAB; “DakoCytomation”, Данія). Зрізи дофарбовували гематоксиліном Майєра та фіксували канадським бальзамом або середовищем VectaMount TM Mounting (“Vector Laboratories”, Inc., США).

Як позитивний контроль було використано препарати інсуліноми підшлункової залози людини, яка характеризується безконтрольним синтезом і викидом у кров’яне русло великих кількостей інсуліну. В негативному контролі реакцію проводили на препаратах інсуліноми без використання первинних антитіл.

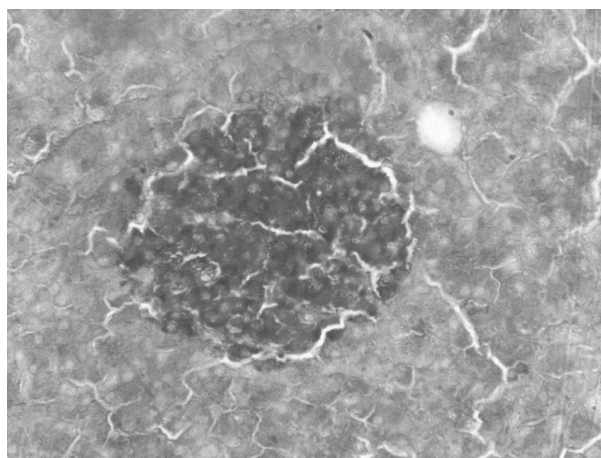
РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для візуалізації β -клітин підшлункової залози морських свинок використовували альдегід-фуксин, який забарвлює базofilні гранули інсуліну всередині клітини в темно-червоний колір. Як видно з рис. 1,а, в нормі центральна частина острівців Лангерганса заповнена β -клітинами, в цитоплазмі яких спостерігаються інтенсивно зафарбовані невеликі

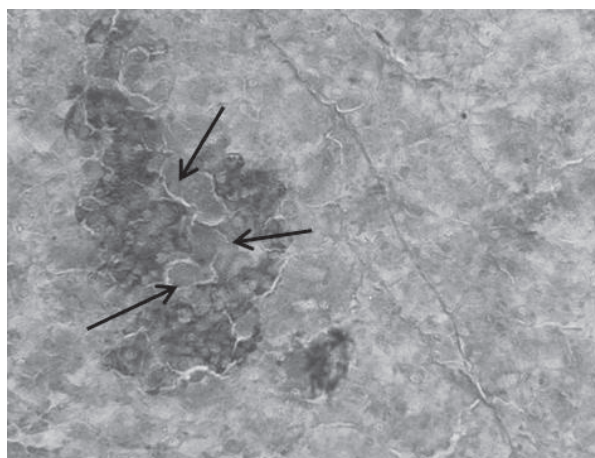
гранули. Це вказує на нормальну продукцію інсуліну всередині клітин. Зменшення інтенсивності забарвлення (див. рис. 1,б) свідчить про дистрофію β -клітин і розвиток метаболічного синдрому. Застосування цього методу дає змогу визначати відносний рівень вмісту клітин в острівках Лангерганса, в яких відбувається синтез інсуліну, таким чином оцінюючи функціональний стан β -клітин.

Слід відмітити, що в препаратах підшлункової залози морських свинок в нормі спостерігається рівномірне забарвлення клітин острівців Лангерганса, що свідчить про нормальну продукцію інсуліну (рис. 2,а). Розвиток метаболічного синдрому та гіперінсулінемії призводить до виснаження частини β -клітин та припинення синтезу ними інсуліну (див. рис. 2,б). На рисунку такі клітини в острівцях майже не забарвлені. Решта β -клітин, компенсуючи інсуліновий дефіцит, синтезують інсулін у кількостях, що значно перевищують норму (більш темне забарвлення). Отримані результати свідчать про те, що застосування цього методу дає змогу визначати відносний рівень інсуліну в β -клітинах острівців Лангерганса.

Для імуногістохімічного аналізу був проведений позитивний та негативний контроль. Як видно з рис. 3,а, в позитивному контролі β -клітини інтенсивно зафарбовані, що свід-

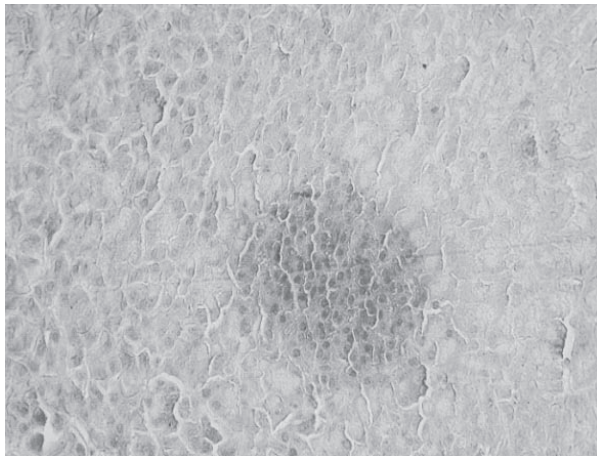


а

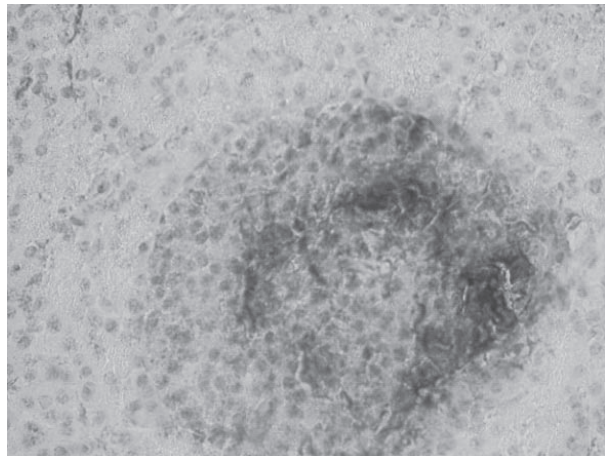


б

Рис. 1. Мікрофотографії тканин підшлункової залози (фарбування альдегід-фуксином): а – контрольні тварини, б – тварини з метаболічним синдромом, 49-та доба. Стрілками вказані дистрофічні зміни острівця Лангерганса. Leica DM 1000, x290



а



б

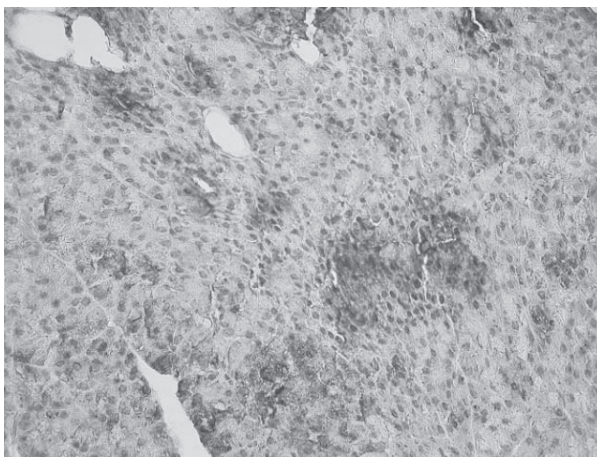
Рис. 2. Мікрофотографії тканин підшлункової залози (фарбування з допомогою первинних моноклональних антитіл Millipore CE9H9 та системи DAB): а – контрольні тварини, б – тварини з метаболічним синдромом, 49-та доба. Leica DM 1000, x290

чить про високий вміст в них інсуліну. В негативному контролі первинні антитіла не використовувались. У зразках негативного контролю імунопозитивна реакція була відсутня, що свідчить про специфічність імуногістохімічної реакції (див. рис. 3,б)

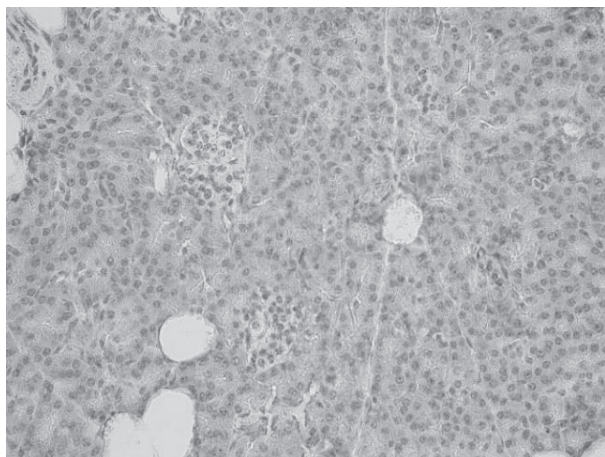
Отримані результати щодо продукції інсуліну порівнювались з показниками вмісту глюкози в крові дослідних тварин для оцінки біологічної ефективності інсуліну. Як показано на рис. 4, розвиток метаболічного синдрому супроводжується підвищенням

концентрації глюкози в крові дослідних тварин впродовж моделювання захворювання. Достовірна різниця між показниками контрольної та експериментальної групи була відмічена на 28-му добу. На 49-ту добу моделювання вміст глюкози у крові дослідних тварин становив 10,05 ммоль/л, що на 70 % вище від контролю.

Таким чином, нами показано, що при моделюванні метаболічного синдрому спостерігаються патологічні процеси, характерні для цього захворювання, а саме: порушення



а



б

Рис. 3. Мікрофотографії препаратів інсуліноми підшлункової залози людини (аналіз за допомогою первинних моноклональних антитіл Millipore CE9H9 та системи DAB): а – позитивний контроль, б – негативний контроль. Leica DM 1000, x290

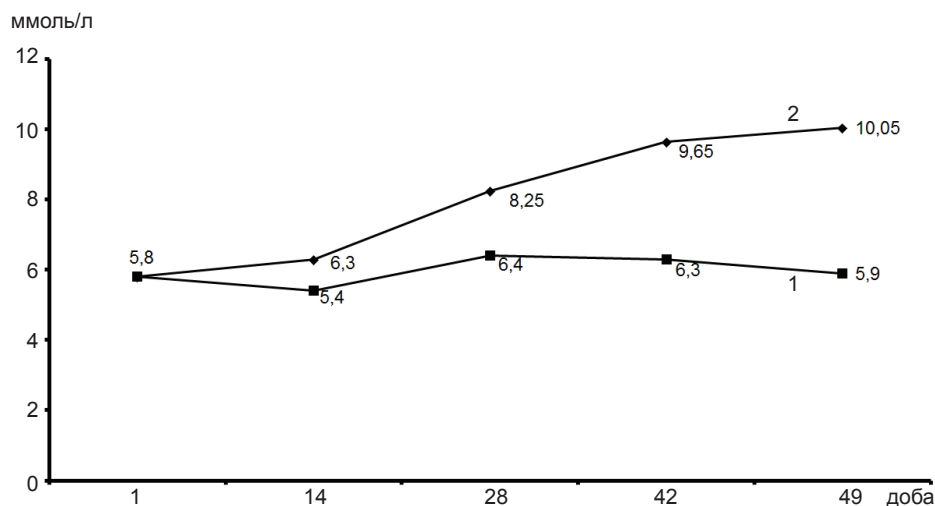


Рис. 4. Динаміка вмісту глюкози в крові контрольних (1) та дослідних (2) тварин

секреції інсуліну, дистрофічні зміни в острівцях Лангерганса та зростання концентрації глюкози в крові дослідних тварин. Посилення секреції інсуліну одночасно з постійно високим вмістом глюкози в крові може свідчити про зниження біологічної ефективності інсуліну, що є ознакою інсулінорезистентності. Описані методи визначення інсуліну разом з їх порівнянням з вмістом глюкози можуть бути використані для оцінки інсулінорезистентності у тих випадках, коли проведення аналізу інсуліну в сироватці крові є неможливим.

Автори висловлюють щире подяку за допомогу в роботі та критичні зауваження співробітникам Інституту молекулярної біології та генетики Максимчук О.В., Хорунженко А.І., Заєць В.М.

В.В. Рушак, М.О. Чашин

ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ИНСУЛИНА В ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЕ МОРСКИХ СВИНОК ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ

Одним из интегральных показателей состояния организма при моделировании метаболического синдрома у животных является уровень продукции инсулина. Сравнение этого показателя с содержанием глюкозы в крови может характеризовать степень резистентности клеток к инсулину. В данной работе проведено определение

содержания инсулина в клетках поджелудочной железы морских свинок в норме и при метаболическом синдроме. Полученные результаты сопоставлены со значениями содержания глюкозы в крови подопытных животных. В работе использовались методы гистохимического и иммуногистохимического анализа продукции инсулина. Было установлено, что воспроизведение метаболического синдрома у морских свинок сопровождается нарушениями синтеза инсулина, дистрофическими изменениями в ткани поджелудочной железы и ростом содержания глюкозы в крови. Полученные результаты позволяют говорить о наличии у подопытных животных инсулинорезистентности, которая является основным патогенетическим механизмом в развитии метаболического синдрома.

Ключевые слова: иммуногистохимия, поджелудочная железа, морские свинки, инсулин, метаболический синдром.

V.V. Ruschak, M.O. Chashchyn

INSULIN DETERMINATION IN PANCREAS OF GUINEA PIGS WITH METABOLIC SYNDROME

The level of insulin production is one of the integral parameters during the modeling of metabolic syndrome in animals. Comparison of this parameter with blood glucose level can characterize the degree of insulin resistance of cells. In this work we determined the level of insulin in pancreatic cells of guinea pigs under normal conditions and during metabolic syndrome. The obtained results were compared with the blood glucose level of experimental animals. In this work we used the methods of histochemical and immunohistochemical analysis of insulin production. It was found that in guinea pigs metabolic syndrome modeling is accompanied by impaired insulin synthesis, degenerative changes in pancreatic tissue and increased blood glucose level. The data obtained suggest

that the experimental animals have insulin resistance, which is the main pathogenetic mechanism in the development of metabolic syndrome.

Key words: immunohistochemistry, pancreas, guinea pigs, insulin, metabolic syndrome.

Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

REFERENCES

1. Kravets E., Samoilov Y. et al. Metabolic syndrome in a total medicine practice. Bulletin of Siberian medicine. 2008: № 1: 80-87
2. Ambrosova T.N., O.N. Kovalyova, T.V. Ascheulova. Role of carbohydrates metabolism disorders and proinflammatory cytokines activity in development of obesity-associated hypertens. Ukr. Cardiol Journ.: 5: 2009.
3. Danilova, L. Insulin resistance phenomenon in clinical practice. Lechebnoe delo. 2009: 2 (6): 29-40.
4. Bouzakri K., Zierath J. MAP4K4 gene silencing in human skeletal muscle prevents tumor necrosis factor- α -induced insulin resistance. J Biol Chem. 2007: 282(11):7783-9
5. Chazova I., Mychka V. Metabolic syndrome. Russian Medical Journal. 2004: 163.
6. Adiels M., Olofsson S.O., Taskinen M.R. et al. Overproduction of very low-density lipoproteins is the hallmark of the dyslipidemia in the metabolic syndrome. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2008: 28 (7): 1225-1236.
7. Gordon C. Weirand, Susan Bonner-Weir. Five Stages of Evolving Beta-Cell Dysfunction During Progression to Diabetes. Diabetes. 2004: 53 (3): 16-21
8. Haist R., Davidson J. A study of the levels of extractable insulin of guinea pig pancreas. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. 1964: 42(3): 315-317
9. Smith, Leslie F. Amino Acid Sequences of Insulins. Diabetes. 1972: 21 (2): 457-460
10. Neubauer, H., Schune, H. The Immunogenicity of Different Insulins in Several Animal Species. Diabetes. 1978: 27 (1): 8-15
11. Conlon J.M. Evolution of the insulin molecule: insights into structure-activity and phylogenetic relationships. Peptides. 2001: 22(7):1183-93.
12. Rushchak V., Kovalenko V. et al. Optimization of animal model for investigation of pathogenesis of metabolic syndrome. Fiziologichnyj Zhurnal. 2012: 58 (6): 29-35
13. Sarkisov D., Perov J., editors. Microscopically technique. Moscow: Medicine: 1996.
14. Kumar G., Rudbeck L., editors. Immunohistochemical staining methods. Fifth Edition. Carpinteria, California: Dako North America: 2009.

Ін-т молекуляр. біології та генетики НАН України, Київ
E-mail: v.v.rushchak@gmail.com

Матеріал надійшов
до редакції 12.11.2013