

Черепанова М.А.

## ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ АНТИАПОПТОТИЧЕСКОГО БЕЛКА BCL-2 В ПЕЧЕНИ В МОДЕЛИ ОЖИРЕНИЯ И САХАРНОГО ДИАБЕТА 2-ГО ТИПА И ПРИ КОРРЕКЦИИ ЛИНАГЛИПТИНОМ

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии»  
(630060, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2, Россия)

XXI век известен как век ожирения и сахарного диабета 2-го типа – эти заболевания являются основными причинами неалкогольной жировой болезни печени. Тяжёлые формы болезни, такие как неалкогольный стеатогепатит и цирроз печени, связаны с процессом апоптоза. Известны различные пути активации и подавления апоптоза. В печени мышей в модели ожирения и сахарного диабета 2-го типа основными активаторами процессов апоптоза являются интенсивность липопероксидации и окислительного стресса в клетках. Целью настоящего исследования стало изучение особенностей влияния линаглиптина на процессы апоптоза в печени в модели ожирения и сахарного диабета 2-го типа на основании экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2. Исследование проводилось на самцах db/db мышей, которые имеют дефект гена рецептора лептина. Линаглиптин или плацебо вводились ежедневно через желудочный зонд с 10-й по 18-ю недели жизни. У мышей, получавших плацебо, была выявлена слабая экспрессия антиапоптотического белка Bcl-2, в то время как у группы, получавшей линаглиптин было зафиксировано значительное усиление его экспрессии. Полученные данные свидетельствуют о «попытке» линаглиптина воздействовать на клетки печени и ограничить развитие апоптоза.

**Ключевые слова:** сахарный диабет 2-го типа, печень, линаглиптин, апоптоз

## PECULIARITIES OF THE ANTIAPOPTOTIC BCL-2 PROTEIN EXPRESSION IN LIVER IN A MODEL OF OBESITY AND TYPE 2 DIABETES AND WITH LINAGLYPTIN CORRECTION

Cherepanova M.A.

Scientific Institute of Clinical and Experimental Lymphology  
(ul. Timakova 2, Novosibirsk 630060, Russian Federation)

*Background.* XXI century is known as a century of obesity and type 2 diabetes (T2D), one of the main reasons of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Severe forms of NAFLD, such as non-alcoholic steatohepatitis and cirrhosis, are associated with process of apoptosis. A great contributor in the developing of NAFLD is a dysfunction of hemato-lymphatic barrier and linagliptin showed positive effect on this. The group of inhibitors of apoptosis – Bcl-2 resists to wide variety of pro-apoptotic proteins. Studying correction of apoptosis can be the key to the treatment of NAFLD, and that is a reason of high interest in anti-apoptotic Bcl-2 protein.

*Aims.* To assess the features of the expression of the anti-apoptotic Bcl-2 protein in the liver of db/db mice in the model of obesity and type 2 diabetes mellitus and with linagliptin correction.

*Materials and methods.* Experiment was performed on type II (db/db) diabetic mice. Linagliptin or placebo was administered daily by gavage from the 8th to 16th weeks of life.

*Results.* The week immunohistochemical reaction for antiapoptotic protein Bcl-2 was found in placebo-treated mice. Whereas treatment with Linagliptin shifted the ratio of apoptosis regulators following significant increase in the area of Bcl-2 expression.

*Conclusions.* The obtained results demonstrate a “try” at antiapoptotic activity of the Linagliptin in the liver in the model of T2D.

**Key words:** type 2 diabetes, liver, linagliptin, apoptosis

### АКТУАЛЬНОСТЬ

Поддержание гомеостаза органов и тканей на всех уровнях организации живой материи обеспечивается балансом процессов отмирания и обновления клеток. В 70-х годах прошлого столетия группой британских учёных был введён термин «апоптоз» как вид программируемой гибели клеток. Дальнейшие исследования этой области позволили выявить различные пути активации данного процесса: внешний и внутренний. Антиапоптотический белок Bcl-2 играет важную роль в развитии внутреннего, или митохондриального, пути апоптоза. Печень является центральным органом, принимающим участие в липидном обмене и бета-окислении жирных кислот [12]. Основными событиями, приводящими к развитию

апоптоза в модели ожирения и сахарного диабета 2 типа, являются интенсивность липопероксидации и окислительного стресса в клетках, развивающиеся на фоне нарушения кровообращения и лимфотока в печени [9, 10, 11]. В наших предыдущих исследованиях было доказано изменение в функционировании гематолимфатического барьера при развитии ожирения и сахарного диабета 2 типа и при коррекции его линаглиптином [7]. В физиологических условиях в организме процессы апоптоза участвуют в регуляции неограниченной пролиферации клеток и, разрушая клетки с изменённым геномом, способствуют предотвращению развития неопластических процессов [8]. Известно, что неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) является одной из главных причин

развития гепатоцеллюлярной карциномы [14], что указывает на актуальность изучения особенностей апоптоза в модели ожирения и сахарного диабета и при коррекции линаглиптином. Линаглиптин – представитель новой группы сахароснижающих препаратов, селективный ингибитор дипептидилпептидазы 4-го типа (ДПП-4). Доказано положительное влияние линаглиптина на уменьшение потока свободных жирных кислот в печень и липотоксичность, что объясняет возможность применения его для снижения оксидативного стресса и клеточной гибели [5, 6]. Исследования доказывают, что тяжёлые формы НАЖБП, такие как неалкогольный стеатогепатит и цирроз печени, связаны с активацией апоптоза [3], при этом широкому спектру индукторов апоптоза противостоит группа ингибиторов – Bcl-2. Разработка подходов к коррекции апоптоза может определить новые подходы к лечению НАЖБП, что и вызвало интерес изучения антиапоптотического белка Bcl-2.

### ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить особенности экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2 в клетках печени db/db мышей в модели ожирения и сахарного диабета 2-го типа и в условиях коррекции ингибитором ДПП-4 – линаглиптином.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проведены в Центре коллективного пользования «SPF-виварий» Института Цитологии и Генетики Сибирского отделения Российской академии Наук (RFMEFI61914X0005) на самцах db/db мышей – гомозиготных особей линии BKS. Cg-Dock7<sup>m</sup>+/+Lepr<sup>db</sup>], которые имеют дефект гена рецептора лептина. Животные были размещены в комнате с регулярным световым циклом (14 часов света / 10 часов темноты), постоянной комнатной температурой  $24 \pm 2$  °C и относительной влажностью  $45 \pm 10$  %. Мыши содержались на стандартном корме (Ssniff, Германия) и воде *ad libitum*. После рандомизации, экспериментальная группа животных ( $n = 7$ ) получала линаглиптин в дозе 10 мг на 1 кг веса тела внутрижелудочно через зонд 1 раз в день в течение 2 месяцев с 9-й по 18-ю недели жизни (группа «Линаглиптин»). Препарат разводили в 200 мкл физиологического раствора. Самцам группы «Плацебо» ( $n = 7$ ) вводили 200 мкл физиологического раствора без препарата по вышеуказанной схеме. Гибели животных во время эксперимента не было. Мышей выводили из эксперимента методом кранио-цервикальной дислокации и забирали образцы печени для светоптических и иммуногистохимических исследований.

Все экспериментальные работы были выполнены с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации.

Образцы органа фиксировали в 10% забуференном формалине (BioVitrum, Россия) в течение 48 часов, обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации, заключали в гистомикс (BioVitrum, Россия). На микротоме LEICA RM2155 (Германия, Швейцария) получали срезы толщиной 3–5 мкм. Иммуногистохи-

мическое исследование уровня экспрессии белка Bcl-2 проводили на парафиновых срезах печени с помощью непрямого авидин-биотинового АВС-пероксидазного метода с использованием системы визуализации VECTASTAIN ABC HRP Kit (PK-7200, Vector Labs). На последнем этапе иммуногистохимическую окраску осуществляли в хромогенном субстрате, содержащем диаминобензин (раствор готовится *ex tempore* из компонентов набора ImmPACT DAB (SK-4105, Vector Labs). Часть срезов докрашивали гематоксилином Майера, промывали водой и после дегидратации монтировали под покровное стекло. Для количественной оценки экспрессии Bcl-2 в печени мышей проводили компьютерный морфометрический анализ цифровых фотографий, полученных при помощи микроскопа LEICA DM 2500 с видеокамерой LEICA DFC425C (Германия, Швейцария) при увеличении в 400 раз. С помощью программы Image J определяли среднюю площадь и плотность окрашивания (в кв. пикселях).

Статистическую обработку результатов исследований проводили при помощи пакета программ Statistica 6.0. Для анализа данных, подчиняющихся нормальному распределению (средняя площадь экспрессии белка Bcl-2), рассчитывали среднее арифметическое и стандартную ошибку средней арифметической; достоверность различий исследуемых групп устанавливали с помощью t-критерия Стьюдента. Различия сравниваемых величин считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

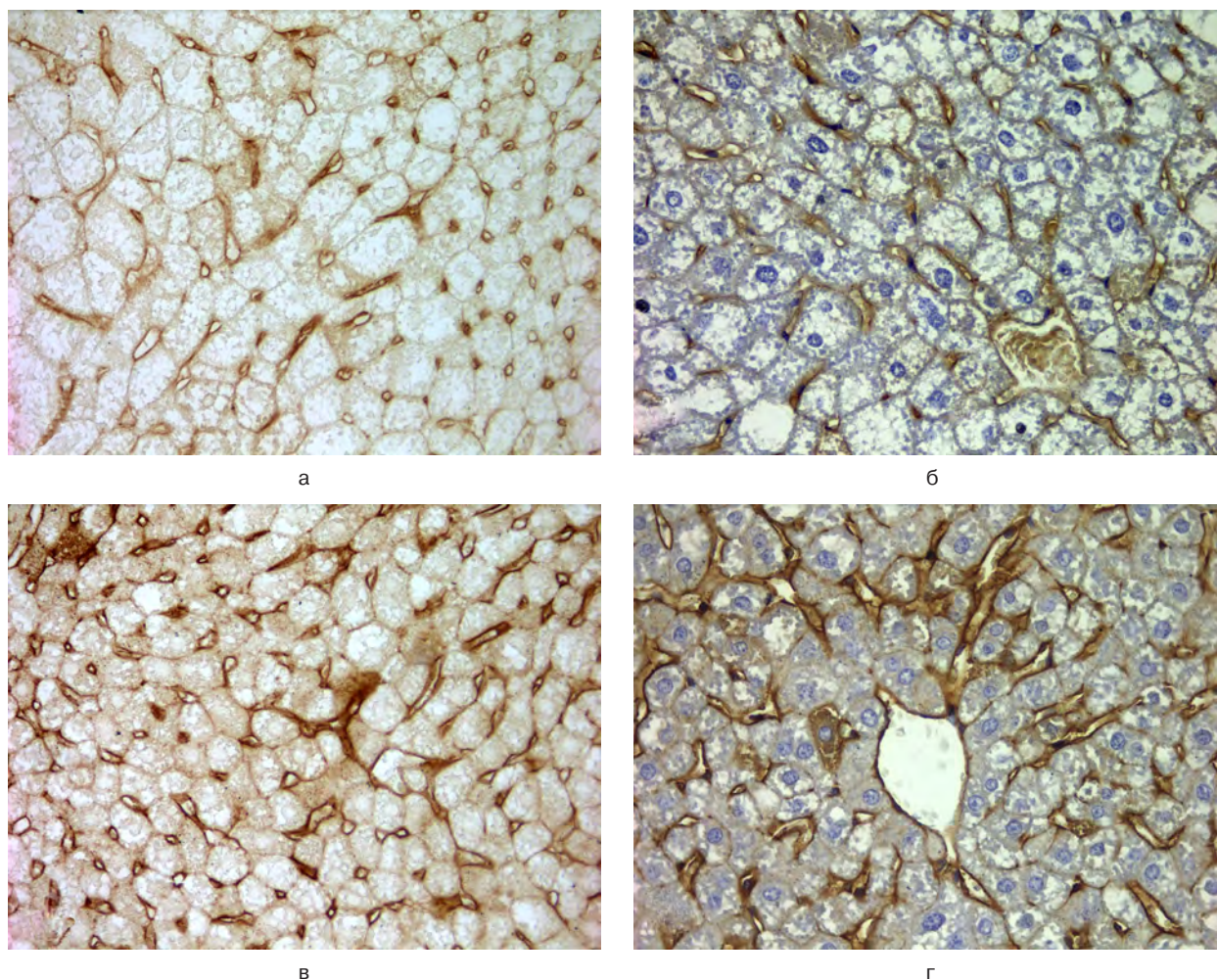
### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При иммуногистохимическом исследовании в печени db/db мышей в группе «Плацебо» определялась минимальная экспрессия антиапоптотического белка Bcl-2, присутствовавшая лишь в отдельных гепатоцитах и в эндотелиальных клетках синусоидов (рис. 1, а и б).

У животных, получавших линаглиптин, при исследовании белка Bcl-2 проявлялось яркое окрашивание клеток гематолимфатического барьера, эпителия желчных протоков, кровеносных сосудов и синусоидов печени. Также выраженная экспрессия антиапоптотического протеина наблюдалась в гепатоцитах, расположенных не только в портальных участках печёночных долек, но и в промежуточных зонах (рис. 1, в и г). Морфометрический анализ показал достоверное увеличение площади иммуногистохимического окрашивания на антиапоптотический белок Bcl-2 в печени мышей, получавших линаглиптин, по сравнению с группой «Плацебо» ( $p < 0,05$ ) (рис. 2).

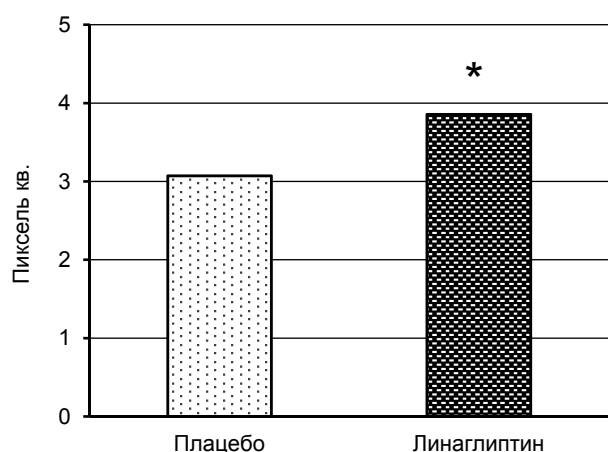
Усиление активности противоапоптотического белка Bcl-2 указывает на наличие антигенной стимуляции и создание антиапоптотической защиты клеток органа, способствующей снижению апоптоза [1]. Однако достоверно оценить антиапоптотический эффект Bcl-2 возможно лишь при оценке экспрессии проапоптотического белка Bad и определения отношения активности Bcl-2/Bad. Это позволит определить, какая активность преобладает в клетках: апоптотическая или антиапоптотическая.





**Рис. 1.** Печень мышей db/db. Иммуногистохимическая окраска непрямым стрептавидин-авидиновым методом для выявления белка Bcl-2: а – группа «Плацебо»; б – группа «Плацебо» с докраской гематоксилином Майера; в – группа с введением линаглиптина; г – группа с введением линаглиптина с докраской гематоксилином Майера. Ув.  $\times 400$ .

**Fig. 1.** Liver of db/db mice. Immunohistochemical staining with an indirect streptavidin-avidin method for the detection of Bcl-2 protein: а – Placebo group, б – Placebo group with counterstaining with Mayer's hematoxylin; в – group treated with linagliptin; г – group treated with linagliptin with counterstaining with Mayer's hematoxylin. Magnification  $\times 400$ .



**Рис. 2.** Площадь иммуногистохимического окрашивания на Bcl-2 в печени db/db мышей, получавших плацебо и линаглиптин. \* –  $p < 0,05$ .

**Fig. 2.** The area of immunohistochemical staining on Bcl-2 in the liver of db/db mice receiving placebo and linagliptin. \* –  $p < 0.05$ .

Фермент ДПП-4 типа представлен во многих тканях, он играет важную роль в развитии прогрессирующих заболеваний печени [4]. Исследования подтверждают эффективность ингибитора дипептидилпептидазы 4-го типа в отношении апоптоза в паренхиматозных клетках печени [2, 13]. Это можно объяснить данными, полученными при изучении морфофункциональной структуры печени при развитии сахарного диабета 2-го типа и при коррекции его линаглиптином [7]. Ранее нами было показано, что у самцов db/db мышей при развитии неалкогольной жировой болезни печени происходит нарушение морфологической организации гематолимфатического барьера органа, что приводит к нарушению дренажа лимфы, ухудшению дезинтоксикационной функции печени, развитию выраженных ультраструктурных нарушений, белково-вакуолярной дистрофии и дисфункции митохондрий. При воздействии линаглиптина выявлено уменьшение застоя лимфы за счёт восстановления структуры лимфатического региона печени и снижения оксидативного стресса [7].

# ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У самцов db/db мышей при развитии НАЖП определялась минимальная экспрессия антиапоптотического белка Bcl-2 в паренхиматозных и синусоидных клетках печени, что говорит о снижении защитных механизмов клеток паренхимы печени. Введение линаглиптина приводило к увеличению площади иммуногистохимического окрашивания на антиапоптотический белок Bcl-2 в печени гомозиготных животных данной линии, по сравнению с группой «Плацебо» ( $p < 0,05$ ), что свидетельствует о «попытке» создания антиапоптотической защиты клеток органа. Полученные результаты свидетельствуют о возможном положительном эффекте линаглиптина в регуляции экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2 в печени мышей в модели ожирения и сахарного диабета 2-го типа.

# ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Мичурина С.В., Архипов С.А., Колесников С.И. Особенности апоптоза гепатоцитов крыс при воздействии бенз(а)пирена // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2014. – № 3. – С. 174–177.  
Michurina SV, Arkhipov SA, Kolesnikov SI. (2014). Peculiarities of the apoptosis in rat's hepatocytes with influence of bens(a)piren [Osobennosti apoptoza hepatotsitov krysa pri vozdeystvii benz(a)pirena]. *Kletochnye tekhnologii v biologii i meditsine*, (3), 174-177.
2. Aroor AR, Sowers JR, Jia G, DeMarco VG. (2014). Pleiotropic effects of the dipeptidylpeptidase-4 inhibitors on the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 307, 477-492.
3. Bechmann LP, Gieseler RK, Sowa JP, Kahraman A, Erhard J, Wedemeyer I, Emons B, Jochum C, Feldkamp T, Gerken G, Canbay A. (2010). Apoptosis is associated with CD36/fatty acid translocase upregulation in non-alcoholic steatohepatitis. *Liver Int*, 30, 850-859.
4. Itou M, Kawaguchi T, Taniguchi E, Sata M. (2013). Dipeptidyl peptidase-4: A key player in chronic liver disease. *World J Gastroenterol*, 19 (15), 2298-2306. doi: 10.3748/wjg.v19.i15.2298

5. Kern M, Klötting N, Niessen HG, Thomas L, Stiller D, Mark M, Klein T, Blüher M. (2012). Linagliptin improves insulin sensitivity and hepatic steatosis in diet-induced obesity. *PLoS One*, 7 (6), e38744. doi: 10.1371/journal.pone.0038744.
6. Manrique C, Habibi J, Aroor AR, Sowers JR, Jia G, Hayden MR, Garro M, Martinez-Lemus LA, Ramirez-Perez FI, Klein T, Meininger GA, DeMarco VG. (2016). Dipeptidyl peptidase-4 inhibition with linagliptin prevents western diet-induced vascular abnormalities in female mice. *Cardiovasc Diabetol*, 15, 94. doi: 10.1186/s12933-016-0414-5.
7. Michurina SV, Ischenko Iju, Klimontov VV, Archipov SA, Myakina NE, Cherepanova MA, Zavjalov EL, Koncevaya GV, Konenkov VI. (2016). Linagliptin alleviates fatty liver disease in diabetic db/db mice. *World J Diabetes*, 7 (19), 534-546.
8. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. (2010). Genomic instability – an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11 (3), 220-228. doi: 10.1038/nrm2858.
9. Nolan CJ, Larter CZ. (2009). Lipotoxicity: why do saturated fatty acids cause and monounsaturates protect against it? *J Gastroenterol Hepatol*, 24, 703-706. doi: 10.1111/j.1440-1746.2009.05823.x.
10. Orrenius S. (2007). Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death. *Drug Metab Rev*, 39, 443-455.
11. Rolo AP, Teodoro JS, Palmeira CM. (2012). Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med*, 52, 59-69.
12. Ryu SY, Peixoto PM, Teijido O, Dejean LM, Kinnally KW. (2010). Role of mitochondrial ion channels in cell death. *Biofactors*, 36, 255-263. doi: 10.1002/biof.101.
13. Shah P, Schumann DM, Ardestani A, Shu L, Paroni F, Kerr-Conte J, Pattou F, Klein T, Maedler K. (2013). The DPP-4 Inhibitor linagliptin restores  $\beta$  cell function and survival in human isolated islets. *J Clin Endocrinol Metab*, 98 (7), E1163-72. doi: 10.1210/jc.2013-1029.
14. Yang KC, Hung HF, Lu CW, Chang HH, Lee LT, Huang KC. (2016). Association of non-alcoholic fatty liver disease with metabolic syndrome independently of central obesity and insulin resistance. *Sci Rep*, 6, 27-34. doi: 10.1038/srep27034.

# Сведения об авторах Information about the authors

**Черепанова Марина Александровна** – младший научный сотрудник лаборатории эндокринологии, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии» (630060, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2; e-mail: Marusia@211.ru)  
**Cherepanova Marina Alexandrovna** – Junior Research Officer at the Laboratory of Endocrinology, Scientific Institute of Clinical and Experimental Lymphology (630060, Novosibirsk, ul. Timakova, 2; e-mail: Marusia@211.ru)