

Министерство науки и высшего образования
Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ ИММУНОЛОГИИ И ФИЗИОЛОГИИ

Уральского отделения Российской академии наук

УДК: 616-092.9

На правах рукописи

БУЛАВИНЦЕВА ТАТЬЯНА СЕРГЕЕВНА

**ВЛИЯНИЕ МАКРОФАГОВ НА СОСТОЯНИЕ ИНСУЛИН-
СИНТЕЗИРУЮЩИХ КЛЕТОК РАЗЛИЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ В
ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЕ**

3.3.3. Патологическая физиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

Юшков Борис Германович,
член-корреспондент РАН,
д.м.н., профессор, ЗДН РФ

Екатеринбург – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1 – ИНСУЛИН-СИНТЕЗИРУЮЩАЯ СИСТЕМА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ: ФИЗИОЛОГИЯ, ДЕСТРУКЦИЯ И РЕГЕНЕРАЦИЯ (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР).....	12
1.1– Инсулин-синтезирующие структуры поджелудочной железы	12
1.1.1 – Морфофункциональная характеристика инсулин-синтезирующих структур.....	12
1.1.2 – Инсулин-синтезирующие структуры в онтогенезе	18
1.2 – Роль микроокружения в формировании инсулин-синтезирующих структур.....	22
1.2.1 – Островок Лангерганса	22
1.2.2 – Внеостровковые инсулин-синтезирующие структуры	28
1.3 – Обеспечение структурно-функционального постоянства инсулин- продуцирующих структур.....	30
1.3.1 - Повреждение инсулин-синтезирующих клеток поджелудочной железы	30
1.3.2 - Источники восстановления инсулин-синтезирующих структур	33
Резюме	40
ГЛАВА 2 – МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	42
2.1 – Общая характеристика экспериментальных животных.....	42
2.2 – Моделирование патологии инсулин-продуцирующей системы	43
2.3 – Модулирование функционального состояния системы мононуклеарных фагоцитов.....	45
2.2 – Методы исследования.....	46
2.2.1 – Исследование гематологических показателей периферической крови экспериментальных животных	47
2.2.2 – Исследование периферической крови экспериментальных животных.....	48

2.2.3 – Морфофункциональное исследование инсулин-синтезирующей системы поджелудочной железы крыс	50
2.3 – Статистические методы обработки экспериментальных данных	58
Список статей, опубликованных по результатам главы 2	59
ГЛАВА 3 – МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИНСУЛИН-СИНТЕЗИРУЮЩЕЙ СИСТЕМЫ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ.....	60
3.1 – Панкреатические островки.....	63
3.2 – Внеостровковые инсулин-синтезирующие структуры	65
Резюме	66
Список статей, опубликованных по результатам главы 3:	68
ГЛАВА 4 – ПОВРЕЖДЕНИЕ ИНСУЛИН-СИНТЕЗИРУЮЩЕЙ СИСТЕМЫ.....	69
4.1 – Ранние сроки повреждения инсулин-синтезирующей системы (3-и и 7-е сутки)	69
4.2 – Поздние сроки повреждения инсулин-синтезирующей системы (30-е, 60-е сутки)	72
4.2.1 – Общая характеристика животных	72
4.2.2 – Морфофункциональная характеристика состояния инсулин-синтезирующей системы	75
4.2.3 – Реакция клеток моноцитарно-макрофагального ряда на повреждение инсулин-синтезирующей системы	98
Резюме	101
Список опубликованных работ по результатам 4 главы:	105
ГЛАВА 5 – ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ МИКРООКРУЖЕНИЯ (РЕЗИДЕНТНЫХ МАКРОФАГОВ) НА ИНСУЛИН-СИНТЕЗИРУЮЩУЮ СИСТЕМУ В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ И ПРИ ЕЕ ПОВРЕЖДЕНИИ	108
5.1 – Общая характеристика животных после введения препарата аминодигидрофтазида натрия.....	109
5.2 – Реакция клеток моноцитарно-макрофагального ряда на введение препарата аминодигидрофтазида натрия.....	109
5.3 – Характеристика инсулин-синтезирующей системы поджелудочной железы	111

5.3.1 – Морфофункциональная характеристика панкреатических островков.....	113
5.3.2 – Морфофункциональное исследование внеостровковых инсулин-синтезирующих структур поджелудочной железы	118
Резюме	123
Список статей, опубликованных по результатам 5 главы	128
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	130
Инсулин-синтезирующая система.....	131
Морфофункциональная неоднородность инсулин-синтезирующих структур и их клеток	132
Инсулин-продуцирующие структуры и их клетки различаются по своей чувствительности к повреждению	135
Инсулин-продуцирующие структуры и их клетки различаются репаративным потенциалом	136
Роль макрофагов микроокружения ИСК в регуляции секреторной функции инсулиноцитов, их повреждении и регенерации	137
ВЫВОДЫ	143
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	145
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	148

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень разработанности. Нарушения углеводного обмена представляют собой одну из важнейших медико-социальных проблем. Отклонения в содержании сахара в крови как в сторону понижения, так и повышения, наносят значительный вред здоровью, а в крайней степени могут привести к летальному исходу [13]. В основе патологии лежит дисбаланс в гормональной регуляции катаболизма и анаболизма углеводов. Поскольку на повышение уровня сахара в крови влияют многие гормоны (глюкагон, кортизол/кортикостероид, адреналин), а на его снижение только инсулин, то продукция последнего представляет собой *locus minoris resistentia* в регуляции углеводного обмена. Инсулинома характеризуется повышением продукции инсулина и приводит к гипогликемии, а недостаточная секреция гормона при сахарном диабете способствует снижению утилизации глюкозы и, соответственно, гипергликемическому состоянию. Хотя первые упоминания о сахарном диабете можно встретить в египетском "Папирусе Эберс", 1500—3000 г. до н. э.) [7], характер пандемии заболевание приобрело уже в наши дни [108]. Общемировое количество больных сахарным диабетом за четыре десятилетия с 1980 г. возросло в 4 раза, достигнув к 2019 г. 463 млн человек, или 9,1% всего населения планеты [6], из них 4,9 млн человек (или 3,35% населения) проживают в России [22].

В связи с вышеотмеченную особую остроту приобретает проблема надежности функционирования системы, продуцирующей инсулин. Патологию углеводного обмена чаще всего связывают с островками Лангерганса поджелудочной железы, которые являются основными его продуцентами. Однако они являются не единственным источником инсулина: помимо β -клеток островков, инсулин-синтезирующие клетки (ИСК) поджелудочной железы также локализируются в составе экзокринного эпителия в виде одиночных клеток или их

агломератов, представляя соответствующие структуры. Если панкреатические островки являются достаточно подробно исследованными, то вопросы физиологии и патологии внеостровковых ИСК и механизмы их взаимосвязи с островками до сих пор остаются мало изученными.

Несмотря на разнообразие структур, в которых выявляются ИСК, можно предположить, что они образуют единую систему, для этого имеется ряд предпосылок. Известно, что ИСК независимо от локализации выявляются на всех этапах развития поджелудочной железы, включая взрослый организм [145, 195], они имеют общего предшественника – плюрипотентные клетки-предшественники кишечной энтодермы [10]. Увеличение общего количества ИСК в неонатальном периоде на 30% связано с их неогенезом путем транс-дифференцировки клеток протокового и ацинарного эпителия [53, 119, 146]. В условиях повышенной потребности организма в инсулине как в физиологических условиях (беременность, изменение диеты), так и в условиях патологии (сахарный диабет), наряду с увеличением размеров и клеточности панкреатических островков отмечается также увеличение количества и функциональной активности внеостровковых ИСК [18, 29, 32]. Кроме того, независимо от локализации, все ИСК выполняют одну функцию – синтез, секреция и процессинг инсулина [29, 30, 43, 89].

Вместе с этим нет единого мнения о вовлеченности различных инсулин-синтезирующих структур в восстановление общего количества ИСК после повреждения. Одни исследователи считают, что во взрослом организме регенерация β -клеток происходит, главным образом, за счет репликации существующих β -клеток, а вклад неогенеза незначителен [58, 82, 119, 176]. Исследования других свидетельствуют о том, что во время репарации панкреатические островки как бы повторяют путь своего эмбрионального развития [119, 132], где рост их связан с рекрутированием новых предшественников из делящихся клеток эпителиального тяжа, а не в результате митоза клеток-предшественников или сохранившихся β -клеток [170]. С этой точки зрения увеличение количества внеостровковых ИСК у взрослых животных происходит в

результате их неогенеза из клеток-предшественников протоков или трансдифференцировки инсулин не синтезирующих клеток (эндокринные клетки островка или клетки экзокринного эпителия) и рассматривается в качестве признака новообразования панкреатических островков [53, 170].

Нахождение ИСК в различных структурах поджелудочной железы ставит вопрос о влиянии на их функцию микроокружения. В последние годы под пристальным вниманием исследователей находится регуляторное влияние макрофагов на физиологические и репаративные процессы в поджелудочной железе и углеводный обмен в целом. Их роль в регуляции эндокринной функции органа чрезвычайно разнообразна и неоднозначна. Они участвуют в регуляции развития островков Лангерганса и их васкуляризации в ходе эмбриогенеза [64, 65], а во взрослом организме – в регуляции секреции инсулина. Макрофаги панкреатических островков способны инициировать и регулировать иммунологическую агрессию против ИСК, а также сами могут непосредственно осуществлять их деструкцию в условиях патологии (сахарный диабет 1 типа) [73, 118]. Макрофаги жировой ткани участвуют в нарушении толерантности к глюкозе и системной инсулинорезистентности в условиях ожирения, что, в свою очередь, приводит к развитию метаболического синдрома и сахарному диабету 2 типа [5]. В то же время известна их способность стимулировать пролиферацию β -клеток [75] и реваскуляризацию островков после повреждения [172]. Все это многообразие регуляторных влияний макрофагов реализуется посредством секреции ими широкого спектра цитокинов и факторов роста [69]. Это, в свою очередь, позволяет предположить возможность оказания значительного влияния на секреторную и регенераторную способность ИСК поджелудочной железы путем модуляции синтетической активности макрофагов как в нормальных условиях, так и на фоне повреждения. Следовательно, методы коррекции нарушений углеводного обмена с применением препаратов, препятствующих пищеварению и всасыванию глюкозы из пищеварительного тракта и заместительной инсулиновой терапии может быть дополнена воздействиями на микроокружение ИСК, что требует отбора специальной группы препаратов.

Цель исследования – охарактеризовать морфофункциональные особенности различных инсулин-синтезирующих структур поджелудочной железы и влияние на них макрофагов.

Задачи исследования:

1. Провести сравнительный анализ морфофункциональных показателей инсулин-синтезирующих клеток различной локализации в паренхиме поджелудочной железы в физиологических условиях.

2. Определить эффект модуляции функциональной активности макрофагов на инсулин-синтезирующие клетки поджелудочной железы здоровых крыс.

3. Дать сравнительную характеристику чувствительности к повреждению различных инсулин-синтезирующих структур поджелудочной железы.

4. Выявить особенности компенсаторно-приспособительных реакций различных инсулин-синтезирующих структур поджелудочной железы на повреждение.

5. Оценить влияние модуляции секреторной активности макрофагов поджелудочной железы на функцию, чувствительность к повреждению и репаративный потенциал инсулин-синтезирующих клеток различной локализации в поджелудочной железе в условиях патологии.

Научная новизна.

Впервые дана сравнительная характеристика инсулин-синтезирующих клеток различной локализации в поджелудочной железе и образуемых ими структур (панкреатические островки, одиночные инсулин-синтезирующие клетки и их агрегаты), выявлена неоднородность их морфофункциональных характеристик, чувствительности к повреждению и репаративного потенциала.

Впервые продемонстрировано, что модуляция секреторной функции макрофагов оказывает выраженное регуляторное влияние на синтетическую активность, чувствительность к повреждению и регенерацию инсулин-синтезирующих клеток поджелудочной железы.

В ходе проведения исследования была создана новая модификация модели аллоксанового диабета, позволяющая снизить летальность экспериментальных

животных на 15% относительно аналогичных моделей и при этом получить стойкую инсулиновую недостаточность и хроническую гипергликемию. На данную экспериментальную модель получен патент № RU 2534411 C1 «Способ моделирования аллоксанового диабета».

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты исследования расширяют теоретические знания о механизмах поддержания структурного и функционального постоянства инсулин-синтезирующей системы после повреждения, а также о роли макрофагов в регуляции ее функции и репарации. Практическая значимость работы состоит в том, что эффекта торможения процессов апоптоза инсулин-сителизирующих клеток и поддержания их адекватной функции в условиях патологии можно добиться, воздействуя на макрофаги как компонент их микроокружения. Для этой цели можно рекомендовать модуляторы функциональной активности макрофагов (например, аминодигидрофталазид натрия).

Положения, выносимые на защиту

1. Инсулин-синтезирующие клетки поджелудочной железы различной локализации отличаются интенсивностью синтетической и пролиферативной активности, уровнем апоптоза и чувствительностью к повреждению.
2. Инсулин-синтезирующие клетки и макрофаги в их микроокружении оказывают взаимное регуляторное влияние.
3. В условиях патологии модуляция секреторной функции макрофагов приводит к снижению уровня пролиферации и повышению синтетической активности инсулин-синтезирующих клеток.

Внедрение результатов исследования в практику.

Результаты исследования внедрены в учебный процесс отдела аспирантуры и в научно-исследовательскую деятельность лаборатории морфологии и биохимии Института иммунологии и физиологии УрО РАН.

Степень достоверности полученных результатов. Направление исследования основано на выводах, сделанных в ходе анализа большого объема современной научной литературы по исследуемому вопросу. Степень

достоверности полученных результатов определяется достаточным объемом выборки, использованием современных высокоинформативных методов (биохимические методы исследования, иммуноферментный анализ, двойное иммуногистохимическое окрашивание) и высокотехнологичного оборудования, а также выбором адекватных критериев статистической обработки результатов. Полученные результаты не противоречат данным, полученным другими авторами и представленным в независимых источниках. Научные выводы, сформулированные в результате проведенного исследования, соответствуют заявленным цели и задачам.

Личный вклад автора. Соискатель Булавинцева Т.С. принимала непосредственное участие в выполнении всех этапов диссертационного исследования. Постановка научной проблемы, формулировка рабочей гипотезы, разработка дизайна эксперимента, анализ и интерпретация полученных результатов проводились совместно с научным руководителем, членом-корреспондентом РАН, доктором медицинских наук, профессором Б.Г. Юшковым. Экспериментальная часть, поиск и анализ научной литературы по теме исследования, получение и обработка данных, статистический анализ данных, написание и оформление диссертации выполнено автором самостоятельно. Результаты исследования представлены в виде публикаций в научных периодических изданиях и докладов на конференциях совместно с соавторами.

Апробация результатов. Основные положения и результаты исследования доложены и обсуждены на IX Всероссийской молодежной научной конференции Института физиологии Коми НЦ УрО РАН (Россия, Сыктывкар, 2010); XXI и XXIII Съезде Физиологического общества им. И.П. Павлова (Россия, Калуга, 2010; Россия, Воронеж, 2017); 5-й ежегодной международной конференции «Актуальные вопросы медицины» (Азербайджан, Баку, 2016); 30-м Конгрессе Европейского Общества патологов (30th Congress of the ESP) (Испания, Бильбао, 2018); XV конференции патофизиологов Урала (Россия, Екатеринбург, 2022); 3-й международной конференции «Врач – Пациент – Общество: иммунология, генетика и закон» (Россия, Екатеринбург, 2023).

Публикации. По теме диссертационной работы опубликовано 18 научных работ, в том числе 14 - в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ (по специальности 3.3.3. Патологическая физиология) и/или индексируемых в международных наукометрических базах: Web of Science, Scopus, Pubmed, получен 1 патент.

Конкурсная поддержка: Работа выполнена в рамках бюджетной Научно-исследовательской темы: «Имунофизиологические и патофизиологические механизмы регуляции и коррекции функций организма» № 122020900136-4 и поддержана грантами УрО РАН № 11-4-НП-145, Carl Zeiss № 64/2013, УрО РАН №15-3-4-17, РФФИ № 16-15-00039, а также УрО РАН №18-7-8-28.

Объём и структура диссертации. Диссертация изложена на 175 страницах печатного текста и состоит из введения, обзора литературы по исследуемому вопросу, описания материалов и методов исследования, 3 глав с результатами собственных исследований, заключения, выводов и списка использованной литературы, включающего 198 источников, среди которых 30 русскоязычных и 168 англоязычных. Работа содержит 24 таблицы и 23 рисунка.

Благодарности. Автор выражает искреннюю признательность специалистам, чей вклад способствовал работе над диссертацией: руководителю лаборатории морфологии и биохимии Института иммунологии и физиологии УрО РАН, доктору биологических наук, доценту И.Г. Даниловой, совместно с которой осуществлялось планирование эксперимента и анализ полученных результатов, доктору медицинских наук, профессору М.Т. Абидову, предоставившему аминоксидогидрофалазид натрия, и старшему научному сотруднику ИИФ УрО РАН, кандидату биологических наук И.Ф. Гетте, совместно с которой осуществлялось моделирование повреждения ИСК и определение биохимических показателей крови экспериментальных животных.

ГЛАВА 1 – ИНСУЛИН-СИНТЕЗИРУЮЩАЯ СИСТЕМА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ: ФИЗИОЛОГИЯ, ДЕСТРУКЦИЯ И РЕГЕНЕРАЦИЯ (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР)

1.1 – Инсулин-синтезирующие структуры поджелудочной железы

Поджелудочная железа совмещает в себе две функции – это секреция пищеварительных ферментов (экзокринная часть) и регуляция обмена веществ путем синтеза и секреции в кровоток комплекса гормонов (эндокринная часть) [42]. Основную массу эндокриноцитов составляют инсулин-синтезирующие клетки (ИСК) [81], большая часть которых располагается в островках Лангерганса – крупных скоплениях пяти типов эндокриноцитов (*рисунок 1*). Кроме того, ИСК выявляются в составе ацинарного и протокового эпителия в виде одиночных клеток и их агломератов (от 2 до 5 ИСК) [42]. Эти внеостровковые ИСК обладают морфологией ткани, в составе которой они локализованы. Исходя из этого, можно выделить следующие структуры, образованные ИСК: островки Лангерганса (панкреатические островки), одиночные ИСК ацинарного и протокового эпителия, агломераты ИСК.

1.1.1 – Морфофункциональная характеристика инсулин-синтезирующих структур

Островки Лангерганса. Островок Лангерганса представляет собой округлый агломерат пяти типов эндокринных клеток: α -, β -, δ -, PP- и ϵ -клеток, секретирующих соответственно глюкагон, инсулин, соматостатин, панкреатический полипептид и грелин. Эндокриноциты, оказывая взаимное влияние на функцию друг друга, поддерживают стабильный уровень глюкозы во внутренней среде организма. Быстрая и скоординированная реакция островков на изменение уровня глюкозы в крови и нервные импульсы обеспечивается передачей сигналов внутри островка через щелевые контакты между клетками или

посредством паракринной секреции гормонов в межклеточное пространство [59]. Снаружи островок окружен неполной капсулой, состоящей из одного слоя фибробластов между двумя базальными мембранами. Первая базальная мембрана располагается под экзокринным эпителием, а другая – под эндокринными клетками [31]. ИСК панкреатических островков (β -клетки) составляют основную массу эндокринных клеток островка.

В то время как α -клетки имеют тенденцию располагаться преимущественно на стороне островка рядом с артериальным притоком и реже вблизи эфферентных венул [90], β -клетки часто организованы в виде розеткообразных скоплений по 8-10 клеток вокруг островковой сосудистой сети, при этом их основания примыкают к артериолам, а вершины клеток указывают на венозные капилляры, что придает секреции инсулина направленность [71].

Необходимо отметить, что β -клетки гетерогенны по своим морфофункциональным характеристикам и могут различаться по уровню экспрессии переносчика глюкозы GLUT2 [112] и глюкокиназы [104], степени грануляции, размеру клетки и клеточного ядра, а также пролиферативной активности [152, 192]. Эти различия характерны не только для представителей различных видов, но также прослеживаются в пределах одного островка. Так, уровень экспрессии транспортера глюкозы GLUT2 на поверхности β -клетки определяет ее чувствительность к изменению концентрации глюкозы в межклеточном пространстве [95]. Различия в степени грануляции и размерах клетки могут отражать гетерогенность функциональной активности клеток, в то время как различие размеров ядра свидетельствует о полиплоидности клеточной ДНК (до $8n$) [87]. Поскольку ИСК образуются в различные временные отрезки и являются долгоживущими и медленно обновляющимися клетками [153], в островке одновременно могут присутствовать молодые, зрелые, стареющие и умирающие клетки.

Функциональная и морфологическая гетерогенность β -клеток островка в физиологических условиях способствует неоднородности реакции на патологические условия, более того, патология сама по себе может способствовать

гетерогенности клеток [179]. Так, метаболический стресс способствует возникновению новых дисфункциональных (де-дифференцированных) подтипов β -клеток [179].

Панкреатические островки также различаются своими размерами, формой, архитектурой, количеством клеток, клеточным составом и степенью васкуляризации [81, 87]. Существуют некоторые видоспецифичные различия в архитектуре островков. У грызунов β -клетки располагаются ближе к его центру, а клетки, не синтезирующие инсулин – к периферии. У человека островок представляет собой агрегат скоплений β -клеток, рассредоточенных по островку довольно неорганизованным образом, хотя встречаются островки и с мантийно-ядерной моделью организации (как у грызунов) [89, 91]. Вместе с этим, у обоих видов архитектура островков зависит от размера, малые островки (<100 мкм в диаметре) относятся к мантийному типу, а крупные островки демонстрируют более сложную организацию [81]. Интересно, что существует верхний предел размера островка для его оптимального функционирования (около 500-700 мкм в диаметре), при этом он одинаков у различных видов животных [81].

Однако, такие различия присутствуют не только у представителей различных видов, но также и в пределах одного организма или органа, при этом они приводят к формированию различных субпопуляций островков со значительными физиологическими последствиями. Островки с высокой перфузией демонстрируют повышенную скорость пролиферации β -клеток и повышенную функцию [37]. В то же время около 25% островков находится в неактивном «спящем» состоянии, но эти островки могут быть «активированы» в ответ на возрастание потребности в инсулине [33]. Помимо островков с нормальным отношением β -клеток к другими эндокриноцитами (1,8 : 1), присутствует достаточно большое количество островков, состоящих почти полностью из β -клеток, и отдельные островки, не имеющие их в своем составе [86].

К тому же, дифференцировка, созревание β -клеток и образование панкреатических островков (ПО), происходят в течении длительного времени, начиная с эмбрионального периода, и продолжают после рождения. Этот факт

создает основу для присутствия в поджелудочной железе β -клеток и островков различного онтогенетического «возраста». Молодые островки содержат большую долю β -клеток, экспрессирующих Ki-67, что согласуется с большей длиной их теломеров [152].

Изменения функциональной нагрузки и патологические состояния также могут влиять на состав и архитектуру островков при сохранении общего количества последних [122]. В условиях повышенной физиологической потребности в инсулине увеличивается общее количество и размеры β -клеток, размеры островков, при этом как у человека, так и у грызунов в центральном ядре островка появляются α -клетки [87]. Необходимо отметить, что повышенный метаболический стресс приводит к ускоренному старению β -клеток [33].

Внеостровковые инсулин-синтезирующие клетки.

Внеостровковые ИСК также характеризуются выраженной морфофункциональной гетерогенностью, которая зависит от их локализации.

Одиночные инсулин-содержащие клетки поджелудочной железы. Около 15% всех ИСК представлены одиночными клетками, которые выявляются в протоках или вдоль них [57], а также в составе ацинусов [171]. Морфологическая структура одиночных ИСК соответствует клеткам эпителия, в котором они находятся.

ИСК протокового эпителия. Одиночные ИСК протоков имеют веретеновидную форму, гранулы инсулина чаще всего сконцентрированы на одном полюсе, а цитокератин-19 (маркер протоковой клетки) на другом полюсе клетки [56]. Исследования показали, что ИСК протока поджелудочной железы взрослого организма, как и островковые β -клетки, представляют собой гетерогенную популяцию клеток [53]. В их составе присутствуют факультативные клетки-предшественники, способные дифференцироваться во все клеточные линии поджелудочной железы, в том числе и ИСК [99, 123], в условиях повышенной метаболической нагрузки или после повреждения [99]. Кроме того, взрослые эпителиальные клетки могут транс-дифференцироваться в ИСК, претерпевая частичный эпителиально-мезенхимальный переход, в условиях средней

гипергликемии и при длительном введении низких доз гастрин и эпидермального фактора роста [47, 182]. Такие ИСК протоков характеризуются низкой способностью к миграции от протока [133] и низкой экспрессией генов зрелых β -клеток (INS, Glut2 и MafA), что приводит к сниженному секреторному ответу на глюкозу [179].

Ацино-инсулярные клетки. ИСК в составе ацинарного эпителия сочетают в себе черты строения и функции ацинарной клетки и ИСК, имеют коническую форму с ядром, смещенным к базальной части клетки. Они содержат два (или больше) типа гранул, крупные гранулы зимогена и мелкие эндокринные. Ацино-инсулярные клетки, расположенные в составе концевых отделов поджелудочной железы, выделяют зимогенные и эндокринные гранулы в систему выводных протоков [29, 30] и участвуют таким образом в регуляции функции эпителия стенки кишечника [43, 94]. Клетки, не имеющие связи с выводными протоками, осуществляют свою секрецию в межклеточное пространство, либо в кровеносное русло [29, 30]. Секретируемые ими в клеточную среду гормоны (в частности инсулин) реализуют паракринную регуляцию функции экзокринной части поджелудочной железы, стимулируя базальный синтез амилазы и ее секрецию [18, 41, 59, 89]. В то же время, секреция пищеварительных ферментов в кровеносное русло способствует модификации циркулирующих гормонов и ростовых факторов, повышая их биологическую активность [29, 30]. Не исключено также, что эти ферменты участвуют в деградации биологически активных веществ [41].

Кроме того, необходимо отметить, что такие «ацино-инсулярные» клетки выявляются не только в составе ацинусов фетальной и взрослой поджелудочной железы, но также присутствуют в сформированных островках. Часть исследователей представляет такие клетки в качестве возможных эндогенных предшественников ИСК [195], в то время как другие рассматривают их в качестве переходных клеток в процессе трандифференцировки ациноцита в ИСК или, наоборот, в период эмбриогенеза и в условиях повышенной физиологической нагрузки или патологии [61, 198].

Таким образом, ацино-инсулярные клетки поджелудочной железы можно рассматривать с двух позиций: в качестве самостоятельного типа клеток поджелудочной железы, участвующих в паракринной и эндокринной регуляции пищеварения и углеводного обмена, либо как регенераторного пула.

Агломераты. На всех этапах эмбрионального развития поджелудочной железы в большом количестве выявляются агломераты диаметром менее 20 мкм из внеостровковых эндокриноцитов (до 5 клеток), которые рассматриваются в качестве начального этапа формирования островков [121, 132]. При этом, в отличие от островков, они не содержат в своем составе глюкагон-, соматостатин- или полипептид-иммунореактивные клетки и не окружены капсулой [56]. ИСК агломератов имеют морфологию эпителия, в котором локализованы (ацинарных и/или протоковых клеток) и располагаются преимущественно в протоках или вдоль них [56, 171].

У взрослого организма в составе таких агломератов присутствует большое количество клеток-предшественников, обладающих способностью дифференцироваться в функциональные эндокринные клетки [57, 119]. Эти клетки-предшественники характеризуются низкой экспрессией переносчика глюкозы (GLUT2) и соответственно низкой секрецией инсулина в ответ на глюкозу, а также высокой скоростью пролиферации и экспрессией факторов транскрипции, связанных с ранним эндокринным развитием [47]. Количество этих клеток-предшественников хотя и снижается с возрастом, однако они присутствуют и у пожилых [46].

Хотя многие исследования свидетельствуют, что во взрослом организме регенерация β -клеток происходит главным образом за счет репликации существующих β -клеток, а вклад неогенеза незначителен [59, 82], увеличение количества внеостровковых ИСК у взрослых животных в большей части проанализированной литературы рассматривается в качестве признака новообразования и/или регенерации панкреатических островков. Необходимо отметить, что увеличение количества этих клеток происходит в результате

дифференцировки клеток-предшественников и/или транс-дифференцировки из ацинарных клеток, а не из существующих ИСК посредством репликации [117,132].

ИСК различной локализации в поджелудочной железе связаны общностью эмбрионального происхождения (кишечная энтодерма) и выполняемой функции – регуляция обмена веществ на системном и/или локальном уровне в результате синтеза/секреции инсулина и участия в его созревании, путем продукции смешанными ИСК ацинарного эпителия протеолитических ферментов и их выведения в кровоток. Это позволяет объединить инсулин-синтезирующие структуры в единую систему согласно определению П.К. Анохина: «Биологическая система – совокупность функционально связанных элементов или процессов, объединенных в целое для достижения биологически значимого результата» [2].

Вместе с этим отдельные элементы данной системы являются неоднородными по своим морфофункциональным характеристикам. Такая гетерогенность закладывается уже в период эмбриогенеза и является основой устойчивости инсулин-синтезирующей системы к изменению физиологической потребности в инсулине и/или повреждению.

1.1.2 – Инсулин-синтезирующие структуры в онтогенезе

Процесс формирования эндокринной части поджелудочной железы происходит постепенно, начинаясь в эмбриональном периоде, где почти 45% β -клеток присутствуют в виде агломератов ИСК, и продолжается после рождения [53].

Острова Лангерганса.

Эмбриональный период. Эндокринные и экзокринные клетки поджелудочной железы имеют общий эмбриональный зачаток – кишечную энтодерму [10]. Формирующиеся островки сохраняют свою связь с эпителиальными канальцами, из которых они происходят, на протяжении всего развития [170]. Дифференцирующиеся предшественники эндокриноцитов поддерживают клеточные контакты на протяжении всего своего развития, и островок формируется как растущий «полуостров», рост которого связан с рекрутированием новых

предшественников из делящихся клеток эпителиального тяжа, а не в результате митоза самих клеток-предшественников. Последовательность дифференцировки эндокриноцитов является видоспецифичной, у грызунов первыми дифференцируются α -клетки [170], а у человека – β -клетки [111]. Это закладывает основу для окончательной архитектуры островка: мантийно-ядерную структуру у грызунов и совокупность нескольких небольших структур «полуостровов» у человека [170].

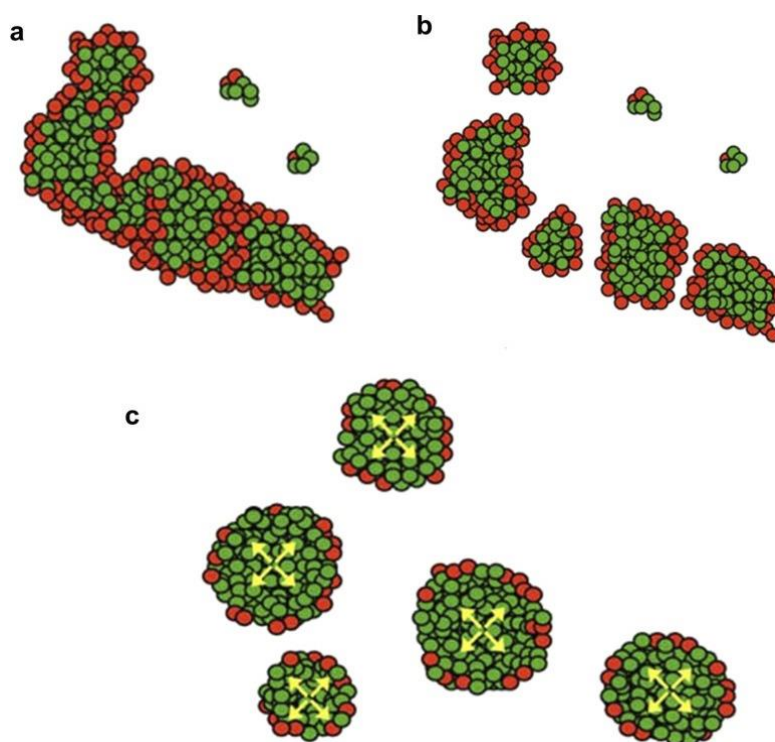


Рисунок 1 – Схема образования островков в результате деления

тяжеобразной структуры во время развития плода и новорожденного [170]

Примечание: β -клетки отмечены зеленым цветом, α -клетки отмечены красным цветом. **a** – пролиферация эндокринных клеток при сохранении межклеточных контактов с формированием разветвленной тяжеобразной структуры, **b** – разделение тяжеобразной структуры с формированием дискретных островков различного размера, **c** – увеличение количества β -клеток приводит к снижению доли α -клеток до 5-10% от общего количества клеток.

Предполагают, что эндокринная ткань поджелудочной железы на ранних этапах органогенеза представляет собой длинные структуры соединенных между собой островков, располагающихся вдоль первичных протоков. Образование дискретных островков происходит в результате случайного процесса деления этой общей эндокринной структуры, следующего за пролиферацией эндокринных

клеток. В результате этого архитектура островков становится более организованной по мере увеличения гестационного возраста (Рисунок 1). Случайный характер деления общей эндокринной структуры приводит к формированию у взрослой поджелудочной железы островков различных размеров [87].

Неонатальный период. При рождении поджелудочная железа не является еще полностью зрелой и продолжает свое развитие в течение перинатального периода, достигая размеров и морфологии взрослого организма к моменту отлучения от грудного вскармливания [145].

Увеличение общего количества ИСК в неонатальном периоде на 70% связано с репликацией уже существующих β -клеток и на 30% с их неогенезом, происходящим на периферии островков из клеток протокового и ацинарного эпителия [53, 119]. Скорость репликации β -клеток в этот период максимальна и снижается к подростковому возрасту [145, 156]. Неогенез ИСК приводит к увеличению количества агломератов ИСК [145, 156], однако основным механизмом развития эндокринной части поджелудочной железы в это время является увеличение размеров островков, а не их числа [81].

В этот период β -клетки проходят процесс созревания, который приводит к переходу от секреции инсулина, стимулируемой аминокислотами, к секреции инсулина, стимулируемой глюкозой, что совпадает с изменениями в пищевой среде [67, 162, 186].

Период зрелости. Во взрослом организме увеличение общего количества β -клеток происходит главным образом посредством репликации существующих β -клеток островков [119]. У взрослого организма в поджелудочной железе присутствуют субпопуляции с различной степенью зрелости β -клеток. Небольшая популяция клеток с незрелым фенотипом обладает повышенным пролиферативным потенциалом и сниженной функциональной активностью, в то время как зрелые β -клетки характеризуются низкой пролиферативной активностью и высокой секрецией инсулина в ответ на повышение уровня глюкозы [162].

Период старения. В процессе старения организма отмечается увеличение площади панкреатических островков, при сохранении их количества [120, 190]. Также значительно повышается доля старых β -клеток [120], которые содержат укороченные теломеры [152], высокую экспрессию маркера старения p16 [33], перестают делиться и характеризуются нарушением секреции в ответ на высокие концентрации глюкозы [101, 120]. Также они содержат на своей мембране большое количество рецепторов к IGF-1 (IGF1R), они более чувствительны к действию повреждающих факторов и характеризуются сниженной способностью к регенерации [101].

Существует мнение, что снижение секреторной функции β -клеток при старении островков поджелудочной железы у мышей и людей в значительной степени связано с воспалением и фиброзом их кровеносных сосудов [37, 120].

Внеостровковые инсулин-синтезирующие структуры.

У взрослого человека доля внеостровковых ИСК, присутствующих в виде одиночных клеток или их агломератов, существенно снижается к периоду половой зрелости и после этого поддерживается на уровне ~5%. У мышей их количество постепенно снижается на протяжении всей жизни. Однако, у обоих видов пролиферация ИСК агломератов чрезвычайно низкая, что может указывать на изменение клеточной пластичности [46].

Если эмбриональное развитие панкреатических островков исследовано достаточно подробно, то вопрос эмбриогенеза внеостровковых инсулин-секретирующих структур остается мало изученным. К настоящему времени известно, что внеостровковые ИСК выявляются на всех этапах развития, включая взрослый организм [145] и играют значительную роль в образовании эндокриноцитов островка [145, 195]. Существует мнение, что они сами являются эндогенными предшественниками β -клеток островка [53, 195]. Это подтверждается значительной долей (примерно 30%) ИСК, локализованных в агломератах в неонатальном периоде, тогда как в детском возрасте их количество снижается до 20% [46].

Таким образом, ИСК независимо от своей локализации имеют общего предшественника, а гетерогенность инсулин-продуцирующих структур закладывается в период эмбриогенеза и раннего постнатального периода.

1.2 – Роль микроокружения в формировании инсулин-синтезирующих структур

Известно, что на процесс дифференцировки клеток существенное влияние оказывает их микроокружение. Поскольку ИСК поджелудочной железы локализованы в двух гистологически и функционально различных частях органа (эндокринная и экзокринная), можно предположить, что морфофункциональная гетерогенность инсулин-продуцирующих структур может быть обусловлена, хотя бы частично, и этим фактом. С этих позиций особый интерес представляет связь между особенностями микроокружения и типом инсулин-синтезирующей структуры.

1.2.1 – Островок Лангерганса

В создании специфического микроокружения β -клеток островка принимают участие эндокринные клетки, нервные волокна, сосудистое русло и иммунокомпетентные клетки. Все эти компоненты постоянно взаимодействуют с ИСК и участвуют в регуляции их образования и развития в ходе эмбриогенеза, функционировании, адаптации и регенерации во взрослом организме.

Эндокринные клетки. ИСК панкреатического островка находятся в окружении и непосредственном контакте с другими эндокринными клетками (α – глюкагон, δ – соматостатин, ϵ – грелин и РР – панкреатический полипептид), а в настоящее время доказано, что и с иммунокомпетентными клетками (макрофаги), взаимодействия с которыми имеют решающее значение для регуляции эмбрионального развития и секреции инсулина [38]. Эти взаимодействия включают паракринную и аутокринную передачу сигналов (*Рисунок 2*) через молекулы клеточной адгезии (N-CAM, кадгерины), щелевые контакты, а также рецепторы и лиганды эфрина [31].

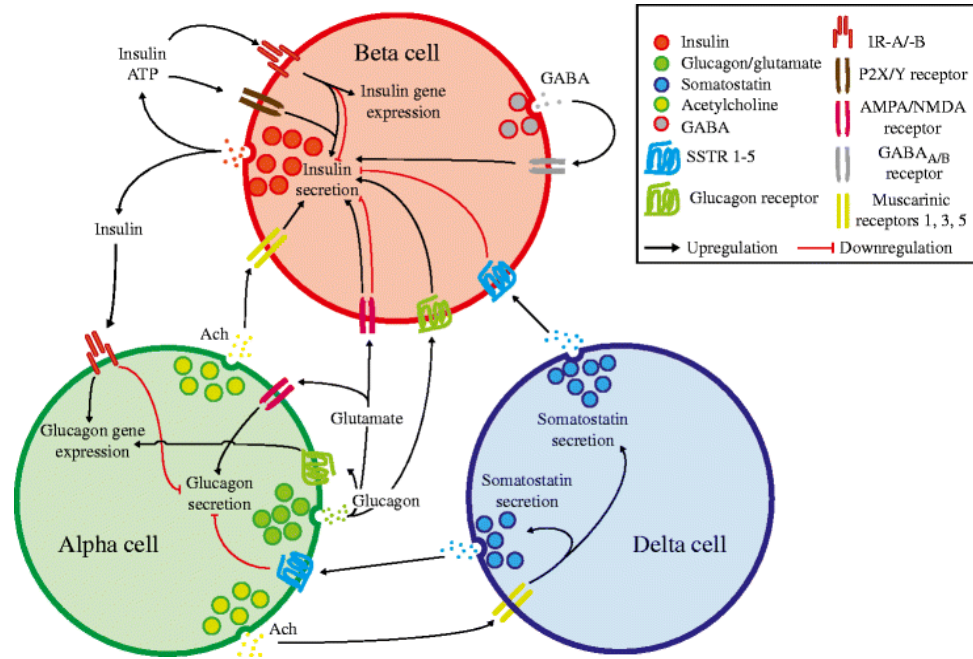


Рисунок 2 – Схема паракринных и аутокринных сигнальных путей в островках Лангерганса млекопитающих [31]

Инсулин, секретируемый β -клетками в ответ на повышение уровня глюкозы в крови, связываясь со своими рецепторами на β -клетках по принципу отрицательной обратной связи снижает собственную секрецию, при этом в α -клетках он стимулирует секрецию глюкагона, но угнетает его экзоцитоз. Вместе с этим, АТФ, содержащаяся в секреторных гранулах вместе с инсулином, действуя на пуриnergические рецепторы P2X/Y β -клеток стимулирует секрецию инсулина [37, 59].

ГАМК, секретируемая β -клетками, аутокринным образом усиливает экзоцитоз инсулина и опосредует глюкозозависимое ингибирование секреции глюкагона в α -клетках. Высокие уровни как инсулина, так и глюкагона стимулируют секрецию соматостатина δ -клетками, ингибирующего функцию β - и α -клеток [31], предотвращая тем самым их гиперфункцию [59, 66].

Глюкагон и глутамат, секретируемые α -клетками в ответ на уменьшение уровня глюкозы ниже физиологической нормы, а также на повышение концентрации аминокислот и жирных кислот в крови, что наблюдается при

голодании [66], угнетают функцию β -клеток, усиливают собственный синтез α -клетками и стимулируют секрецию соматостатина δ -клетками [59].

Помимо эндокринных взаимодействий, на функцию β -клеток также влияют и другие элементы их микроокружения, в частности – нервная регуляция, особенности кровоснабжения и лимфатическая система.

Иннервация. Симпатические, парасимпатические и афферентные волокна следуют за кровеносными сосудами и заканчиваются или начинаются вблизи стенок капилляров и эндокринных клеток. Они не образуют классических синапсов с клетками-мишенями, но имеют сайты высвобождения нейротрансмиттеров во внеклеточное пространство, воздействуя более чем на одну мишень одновременно [37, 81], осуществляя тем самым тонкую настройку секреции гормонов через регуляцию кровотока в островках. Как правило, парасимпатическая активация увеличивает высвобождение инсулина, глюкагона, соматостатина, а также панкреатического полипептида у различных видов [77].

Кровеносная система. Хотя островки составляют ~1-2% массы поджелудочной железы человека, артериальное кровоснабжение поджелудочной железы преимущественно течет сначала к островкам и через островки к экзокринной части железы [45]. Это направление перфузии обеспечивает лучшее кровоснабжение островка по сравнению с экзокринной частью органа, а также наиболее точную регуляцию секреции инсулина.

Плотность капилляров и степень их фенестрации в панкреатическом островке в 5-10 раз больше в сравнении с экзокринной частью поджелудочной железы [33, 147, 150]. Кроме того, эндотелиальные клетки островка обладают уникальными рецепторами и способны к экспрессии ингибиторов протеаз и ангиостатического фактора $\alpha 1$ -антитрипсин [151], что может оказывать влияние на созревание про-инсулина в инсулин [29, 30].

Архитектура микроциркуляторного русла островка варьирует в зависимости от его локализации внутри дольки или между ними (*Рисунок 3*) [147]. Если островки расположены на периферии дольки или в непосредственной близости от крупных сосудов, они получают капиллярные ответвления поляризованным

образом, если в центре – то интегрированным. Чем больше островок, тем большее количество точек входа сосудов он имеет [92, 151].

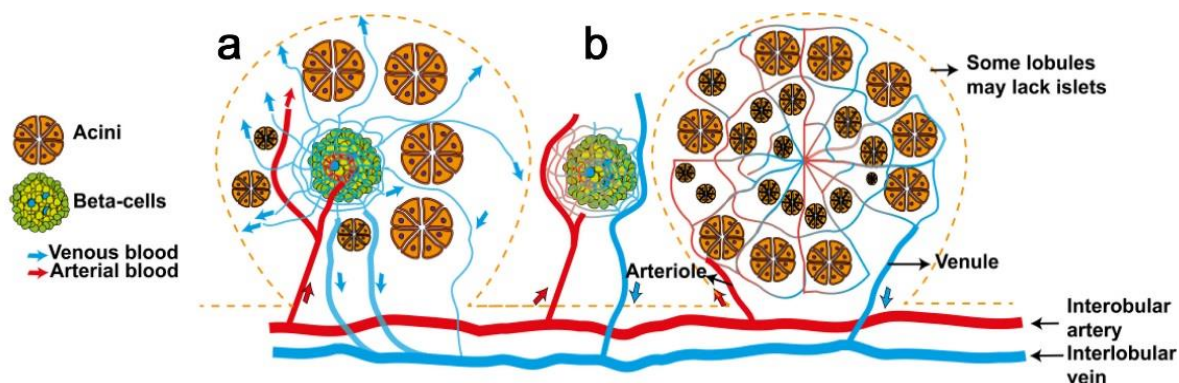


Рисунок 3 – Схематическое изображение кровоснабжения панкреатического островка в зависимости от его расположения [147]

Примечание: **a** – внутридольковое расположение островка с поляризованным кровоснабжением (инсуло-ацинарная система); **b** – междольковое расположение островка с интегральным кровоснабжением (инсуло-венозная система).

Кровоток в островках регулируется гормонами и питательными веществами, которые достигают сосудистой сети островков из отдаленных тканей через кровоток [44].

Сосудистая сеть, с одной стороны, обеспечивает транспорт кислорода, питательных веществ и ключевых метаболических (глюкоза, инкретиновые гормоны (GLP-1) и цитокины) [31] и регуляторных паракринных сигналов [44, 147]. С другой – играет важную роль в обеспечении непищевых сигналов (VEGF-A, HGF, CTGF), которые имеют решающее значение для регуляции пролиферации, дифференцировки и функции клеток экзокринной и эндокринной части органа [31, 91].

Лимфатическая система. Лимфатические сосуды располагаются на периферии панкреатических островков и не контактируют с эндокриноцитами. Однако, их гормоны из межклеточного пространства вместе с током лимфы могут поступать в региональные лимфатические узлы, где возможна иммунологическая презентация аутоантигенов [81].

Клетки лимфоидного ряда панкреатического островка представлены макрофагами, которые происходят из желточного мешка и характеризуются F4/80+ (M1) фенотипом, секретируя TNF α и IL-1 β [73]. Эти клетки выполняют разнообразные функции, от регуляции эмбрионального развития до поглощения апоптотических клеток и патогенов, тем самым участвуя в поддержании тканевого гомеостаза [38].

Во время эмбрионального развития поджелудочной железы макрофаги обнаруживаются уже на 14-15 день в непосредственной близости от инсулин-положительных β -клеток [184]. После рождения в период грудного вскармливания, когда заканчивается формирование эндокринной ткани поджелудочной железы, их количество значительно снижается [97]. Участие макрофагов в морфогенезе островков реализуется через M-CSF, IL-6 и VEGF, которые способствуют пролиферации β -клеток и ангиогенезу, обеспечивая адекватное развитие панкреатических островков [97, 175, 184]. Простирая свои филоподии в просвет сосудов и между эндокриноцитами, они участвуют в формировании и поддержании иммунологической толерантности, а в условиях патологии – в развитии аутоиммунитета. Фагоцитируя секреторные гранулы β -клеток, они способны презентировать их содержимое T-лимфоцитам [185], хотя это не обязательно приводит к развитию аутоиммунитета и происходит в физиологических условиях [64]. Макрофаги пери-островковой капсульной зоны выступают в качестве барьера, предотвращая инфильтрацию островка другими типами иммунных клеток [192].

С другой стороны, они принимают участие в точной настройке метаболического гомеостаза [65, 76]. Благодаря своему расположению, внутри-островковые макрофаги контролируют секрецию инсулина β -клетками в ответ на глюкозу [172, 187]. Это происходит посредством обнаружения эндогенного АТФ и инсулина, которые секретируются β -клетками совместно в секреторных везикулах [172, 187] и могут влиять на физиологические процессы в макрофагах [76]. Контроль секреторной функции β -клеток может позволить островковым макрофагам участвовать в регуляции синтеза инсулина и стабильности состава и размера островков путем секреции регуляторных факторов (*Рисунок 4*).

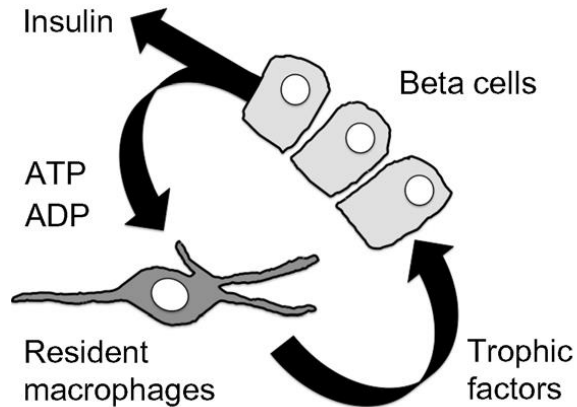


Рисунок 4 – Одна из предложенных моделей связи макрофагов с β -клетками панкреатического островка [187]

Помимо контроля секреторной активности β -клеток макрофаги оказывают непосредственное влияние на секрецию инсулина посредством производства таких факторов, как ретиноевая кислота, IL-1 [77] и компоненты комплемента [138]. Учитывая, что β -клетки экспрессируют всех членов системы регуляции IL-1, а уровень экспрессии рецептора 1 к IL-1 (IL-1R1) является самым высоким среди других тканей организма [50, 52], они весьма чувствительны к действию этого цитокина [110]. Острое, но не хроническое, воздействие IL-1 β стимулирует секрецию инсулина [72]. В период после еды макрофаги из брюшной полости продуцируют IL-1 β в ответ на бактериальные продукты и повышение концентрации глюкозы [85]. А макрофаги островков являются основным источником данного цитокина в микроокружении β -клеток [118]. Исходя из этого, не исключено, что резидентные макрофаги островков также способны продуцировать локальный IL-1 β в течение постпрандиального окна. Стимулирующее влияние IL-1 β на секрецию инсулина связано с усилением экзоцитоза прикрепленных гранул к цитоплазматической мембране [76]. Однако данный эффект теряется в условиях хронического воспаления (сахарного диабета 2 типа) [105]. Молекула C3a из альтернативного пути комплемента также способствует секреции инсулина в β -клетках за счет повышения уровня АТФ и кальция [39, 135]. Низкие концентрации IL-1 β индуцируют пролиферацию клеток

путем активации антиапоптотического пути FAS-FLIP, при этом отсутствие его продукции приводит к подавлению FAS-FLIP и снижению пролиферации [191].

Кроме того, сами островки способны участвовать в формировании необходимого им микроокружения. Так, β -клетками на всех этапах развития в большом количестве секретируется фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), результатом стимулирующего действия которого может быть повышенная плотность капиллярной сети островка [31]. Усиление кровотока при повышении уровня глюкозы обусловлено влиянием инсулина на эндотелиальные клетки сосудов. А поскольку секреция инсулина носит колебательный характер, то это может привести к пульсирующему изменению кровотока в островке [147].

Про-воспалительная активация островковых макрофагов также может быть связана с активирующим действием инсулина, поскольку большинство иммунных клеток, и макрофаги в частности, экспрессируют рецептор к инсулину [76], который совместно с АТФ стимулирует их к секреции про-воспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6 и TNF α [76, 174, 187].

1.2.2 – Внеостровковые инсулин-синтезирующие структуры

Иннервация экзокринной части поджелудочной железы является более скудной в сравнении с эндокринной частью, что может подразумевать преобладание гуморальной регуляции ее функции [81].

Кровоснабжение. Необходимо отметить, что на сегодняшний день нет единого мнения о направлении кровотока в поджелудочной железе. Часть исследователей считает, что артериальный кровоток направлен от островков к экзокринной части (инсуло-ацинарная портальная система) [45, 81, 147], а плотность капилляров и степень их фенестрации в экзокринной части поджелудочной железы в 5-10 раз меньше в сравнении с панкреатическим островком [31, 147, 151]. В то время как исследования других свидетельствуют об одинаковой плотности капилляров в островках и экзокринной части, их интеграции

и наличии двунаправленной циркуляции (как из островка в экзокринную часть, так и наоборот), не зависящей от архитектуры островка [86, 90].

Лимфатическая сеть. Тонкая организация внутренней лимфатической системы поджелудочной железы представлена внутридольковыми лимфатическими сосудами, проходящими в соединительнотканых перегородках рядом с кровеносными сосудами и протоками. При этом они располагаются на расстоянии от ацинусов и на периферии островков. Лимфа, содержащая инсулин и пищеварительные ферменты, поступает от собирательных сосудов через наружную лимфатическую систему в верхнюю полую вену [81].

Лейкоциты экзокринной части поджелудочной железы представлены макрофагами, дендритными клетками, моноцитами, Т- и В-лимфоцитами и ИС клетками. Макрофаги ($F4/80^{hi}CD11c^{-}$) демонстрируют M2 профиль активации и в зависимости от своей локализации представлены двумя субпопуляциями [64]. Первые ($F4/80^{+}CD11b^{+}CD206^{+}$) локализованы преимущественно в перидуктальной области, происходят в результате примитивного кроветворения в желточном мешке или от моноцитов печени плода и имеют ограниченную способность к антигенной презентации. Вторая субпопуляция ($F4/80^{+}CD11b^{+}CD206^{-}$) располагается преимущественно в ацинарной части, происходит в результате дефинитивного гемопоэза и обладает высокой экспрессией МНС-II, что обеспечивает способность стимулировать Т-клеточный ответ на антиген. Обе популяции макрофагов экзокринной части поджелудочной железы являются долгоживущими и самообновляющимися клетками, при этом макрофаги ацинарной части характеризуются достаточно высокой степенью замещения циркулирующими моноцитами [65].

Макрофаги поджелудочной железы выполняют трофическую и регуляторную функции. Это связано с секретируемым ими ИЛ-6, который способствует увеличению количества β -клеток и протоков в ходе эмбриогенеза [97]. Посредством секреции VEGF резидентные макрофаги участвуют в регуляции ангиогенеза.

Таким образом, ИСК различной локализации характеризуются специфическим микроокружением, которое формируется еще на этапе эмбриогенеза и характеризуется присутствием про- и противовоспалительно активированных макрофагов, а также различной плотностью капилляров и нервных окончаний.

1.3 - Обеспечение структурно-функционального постоянства инсулин-продуцирующих структур

Как и любая ткань организма, общее количество ИСК не является жестко фиксированным, а динамически меняется в зависимости от потребностей организма и является результатом соотношения процессов образования и деструкции [132]. В ответ на повышение потребности в инсулине в физиологических условиях или при повреждении (панкреатит, токсическое повреждение ИСК) реализуется несколько механизмов адаптации: увеличение синтетической активности ИСК (гипертрофия) и увеличение популяции ИСК за счет их пролиферации или неогенеза (гиперплазия) [83]. А в условиях снижения необходимости в инсулине наблюдается атрофия клеток или включение программы клеточной гибели, которая реализуется через апоптоз или аутофагию [132].

1.3.1 - Повреждение инсулин-синтезирующих клеток поджелудочной железы

В физиологических условиях β -клетки представляют собой долгоживущие, медленно обновляющиеся клетки, возраст которых у людей может достигать нескольких десятилетий [153]. В течении своей жизни клетка проходит несколько циклов митоза, что способствует укорочению ее теломеров. Это в свою очередь приводит к остановке клеточного цикла (в фазах G1/S и G2) и активации синтеза белка p53, запускающего программу апоптоза [174]. Уровень апоптоза β -клеток взрослого организма в норме является низким и остается постоянным на протяжении всей жизни [145]. Аутофагия считается «программируемой» гибелью

всей клетки или деградацией отдельных ее частей с помощью лизосом. В последнем случае она способствует поддержанию клеточного и энергетического гомеостаза [99]. Наиболее значимыми активаторами аутофагии считают окислительный стресс и стресс эндоплазматического ретикула [160]. Оба процесса клеточной смерти, происходящие в физиологических условиях, предотвращают развитие воспаления.

Необходимо отметить, что β -клетки высоко восприимчивы к повреждению, в частности, к действию окислительного стресса. Это связано с их высокой эндогенной продукцией активных форм кислорода на фоне низкой антиоксидантной активности [102]. В качестве повреждающих факторов также могут выступать токсические вещества [93, 126, 166], метаболические нарушения (хроническая гипергликемия и/или гиперлипидемия) [93, 150] и воспаление, развивающееся при инфицировании ткани (вирус Коксаки В, эховирус) или в асептических условиях (панкреатит). Длительные условия повреждения вызывают атрофию, дедифференцировку, а в конечном итоге - смерть ИСК [132, 181].

В настоящее время дедифференцировку определяют, как потерю фенотипической и функциональной стабильности [155], как адаптивный ответ на стрессовый стимул, при этом ее степень зависит от продолжительности травмы. На начальных этапах клетка может снижать экспрессию факторов, критических для ее функционирования, при этом клетки сохраняют нормальную клеточную морфологию и определяющие характеристики. Если стресс имеет слишком большую силу или действует достаточно продолжительное время, это состояние покоя переходит в состояние явной дедифференцировки, что в крайних случаях заканчивается ее гибелью [155, 179]. В норме гибель клетки реализуется путем активации апоптоза, который не приводит к развитию воспалительной реакции, однако в условиях патологии помимо апоптоза также наблюдается некроз. Последний реализуется при повреждении ИСК активными радикалами или в условиях, недостаточных для развития апоптоза [160].

Влияние деструкции β -клеток на структуру панкреатического островка
Вне зависимости от природы повреждающего фактора, деструкция ИСК помимо

изменений на системном уровне (нарушение углеводного обмена) приводит и к локальному нарушению цитоархитектуры и клеточных взаимодействий панкреатического островка [84]. В таких островках увеличивается доля δ -клеток, за счет снижения количества β -клеток с нормальной морфологией. Изменение соотношения подтипов рецепторов к соматостатину у эндокринных клеток островка приводит к нарушению паракринной регуляции секреции инсулина и глюкагона [59, 84]. Повышается угнетающее действие глюкагона и соматостатина на функциональную активность β -клеток. А секретируемый α -клетками глутамат препятствует их регенерации даже в условиях отсутствия действия повреждающего фактора и может индуцировать их гибель [31].

Кроме изменения соотношения эндокриноцитов в островке, также отмечается уменьшение площади его сосудов, что может быть связано с непосредственным действием гипергликемии, аутоиммунным разрушением [149], либо со снижением уровня VEGF-A, продуцируемого β -клетками [151]. Хроническая гипергликемия способствует формированию гиперперфузии островков, которая затем сменяется гипоперфузией, что также может способствовать дисфункции островка [91, 149, 151]. Кроме того, она может способствовать отложению амилоида в периваскулярном пространстве островка, это приводит к нарушению его микроциркуляции и архитектуры [59].

Повреждение ИСК, особенно в случае их некроза, приводит к выраженной инфильтрации островков иммунокомпетентными клетками. Одними из первых в составе инфильтрата определяются макрофаги [184]. В поврежденном островке можно выделить две подгруппы макрофагов: резидентные макрофаги, которые реплицируются *in situ*, и провоспалительные макрофаги, рекрутируемые через моноциты [118].

В качестве хемоаттрактантов для макрофагов могут выступать белки стресса (например, кальгранулин (S100A8)), экспрессированные на поверхности мембраны β -клеток, и IL-1 α , секретируемый в межклеточное пространство [105, 118] или пассивно высвобождаемый из апоптотических клеток [38]. Секреция хемоаттрактантов происходит в ответ на повреждение (вирусная инфекция) [73], в

условиях метаболического (гипергликемия и гиперлипидемия) и оксидативного (воспаление) стресса [110], а также гипоксии [80].

Кроме того, хроническая гипергликемия и гиперлипидемия способствуют макрофагальной пролиферации и секреции макрофагами IL-1, TNF α и INF γ [157]. Повышение уровня этих цитокинов способствует передаче сигналов на толл-подобные рецепторы (TLR) и примированию специфических Т-клеток [126]. Макрофаги, поглощая везикулы β -клеток, содержащие инсулин, участвуют в рекрутировании цитотоксических Т-клеток посредством антигенпрезентирующих механизмов [73, 188].

Кроме рекрутирования Т-клеток в очаг повреждения макрофаги способны непосредственно участвовать в деструкции β -клеток [73]. Секретированные ими провоспалительные цитокины (IL-1, TNF α и INF γ), активируя NF κ B-зависимые пути в β -клетках, индуцируют их апоптоз [73]. Предполагают, что это реализуется посредством межклеточного контакта, а не классического воспалительного цитокина [172]. Помимо инициации β -клеточной гибели M1-подобные макрофаги угнетают их функциональную активность, способствуя дедифференцировке [110].

Таким образом, интерес исследователей направлен на вскрытие причин и механизмов повреждения β -клеток панкреатического островка, в то время как чувствительность к повреждению и особенности деструкции внеостровковых ИСК, а также ее последствия, являются практически не изученными.

1.3.2 - Источники восстановления инсулин-синтезирующих структур

ИСК взрослого организма обладают функциональной гибкостью, позволяющей быстро адаптироваться к изменениям физиологической потребности (беременность и изменение рациона питания) [53, 83, 132]. Однако, они обладают сниженной способностью к восстановлению в условиях патологии [53, 179]. В ответ на повышение функциональной нагрузки (дефицит инсулина) ИСК отвечают увеличением своего количества или повышением уровня секреции инсулина. Образование ИСК может происходить в результате их гиперплазии (пролиферации существующих клеток) и неогенеза (*рисунок 5*) [31, 53, 132]. Оба процесса не

исключают друг друга и происходят в ходе эмбрионального развития, в постнатальном росте и в ответ на повреждение [53].

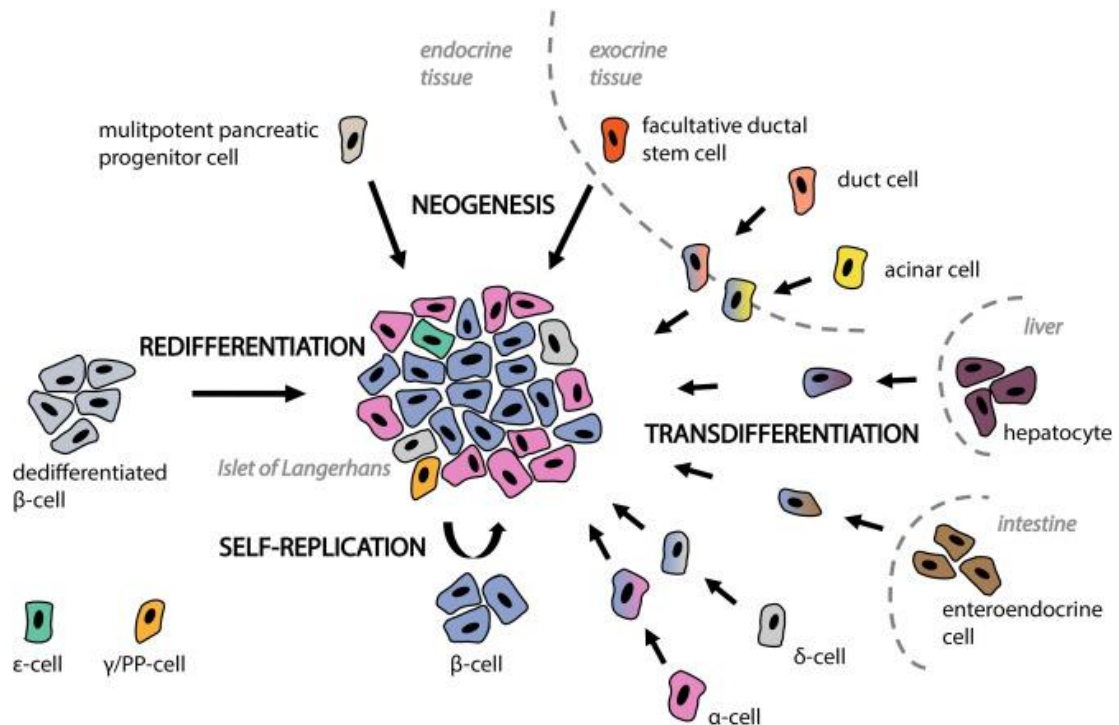


Рисунок 5 – Схема основных механизмов восстановления функциональной массы β -клеток *in situ* [179]

Во взрослом организме можно выделить два основных механизма восстановления инсулин-синтезирующих структур – за счет пролиферации ИСК и за счет неогенеза [179]. Неогенез ПО у взрослого организма наблюдается только в условиях патологии, после значительного их разрушения (перевязка протока или частичная резекция). В этом случае в качестве источника новообразования ПО выступают агломераты ИСК. В физиологических условиях повышение потребности в инсулине приводит к увеличению размеров островков за счет пролиферации их β -клеток [132] и повышению количества внеостровковых структур, главным образом путем их неогенеза из клеток-предшественников или транс-дифференцировки ацинарных и протоковых клеток [53].

Пролиферация ИСК. Исследования свидетельствуют, что примерно 20% β -клеток взрослого организма являются молодыми с высокой пролиферативной

активностью [33], но сниженной функцией, и 80% – это зрелые и метаболически активные клетки [84, 179]. Именно немногочисленная субпопуляция клеток обладает способностью увеличивать количество β -клеток при возрастании потребности в инсулине (беременность, ожирение) или в условиях повреждения [179]. В качестве триггера активации пролиферации рассматривают стресс эндоплазматического ретикулума, действие которого опосредуется через активные формы кислорода (ROS) [179, 197].

Неогенез ИСК. Было предложено несколько вариантов механизма неогенеза ИСК, включая дифференцировку факультативных мультипотентных клеток-предшественников и транс-дифференцировку существующих дифференцированных клеток поджелудочной железы, не синтезирующих инсулин (ацинарные, протоковые клетки и эндокриноциты), а также дифференцировку циркулирующих стромальных стволовых клеток костного мозга [91, 113]. Однако тот факт, что возможно несколько источников неогенеза ИСК, позволяет предполагать, что в разных условиях дефицита реализуются разные механизмы.

Дифференцировка клеток-предшественников. Большинство исследователей сходится во мнении, что клетки-предшественники эндокриноцитов поджелудочной железы локализованы в островках Лангерганса и в протоках [123, 167, 179].

Клетки предшественники протоков (Ngn3+) в условиях повышенной физиологической потребности в инсулине и патологических условиях дифференцируются в δ -клетки, которые в свою очередь дают начало β -клеткам [99]. Центроацинарные клетки, которые лежат на границе ацинарных и терминальных клеток протоков, также считаются кандидатами в клетки-предшественники поджелудочной железы (179).

Кроме того, многие исследования привели к мысли, что помимо собственных стволовых клеток или клеток-предшественников поврежденного органа/ткани в его регенерации могут принимать участие также эндогенные взрослые стволовые клетки (ASC), мобилизованные (мигрирующие) из своих ниш в других тканях (например, ASC костного мозга) в зону повреждения, где они участвуют в

восстановлении или регенерации тканей. Возможность управления этим процессом открывает возможность создания новых неинвазивных методов клеточной терапии, которые имеют очевидное преимущество перед процессами сбора и реинтродукции ИСК [108].

В связи с этим большой интерес представляют внеостровковые ИСК, локализованные в составе протокового или ацинарного эпителия в виде одиночных клеток или их агломератов. Ряд исследований свидетельствует, что ИСК протоков и часть клеток агломератов имеют признаки незрелых клеток. Они характеризуются повышенной экспрессией генов, участвующих в раннем развитии β -клеток (MafB, Pax4, Pax6, Ngn3), в то время как экспрессия Glut2 и глюкоз-стимулированная секреция инсулина снижены [179].

Также в последние годы внимание исследователей привлекает способность β -клеток дедифференцироваться под действием метаболического или оксидативного стресса [179]. Эти дедифференцированные клетки проявляют повышенную скорость пролиферации и приобретают стволовые, незрелые черты, в то время как экспрессия маркерных генов зрелых β -клеток, содержание инсулина и диабетических антигенов снижены [179]. Дедифференцированные клетки становятся податливыми для дифференцировки в другие клеточные линии под действием внешней стимуляции [155]. Таким образом, создается пул возможных клеток-предшественников, которые потенциально могут быть повторно дифференцированы, приводя к восстановлению метаболического гомеостаза [155, 179].

Транс-дифференцировка. Еще один источник неогенеза ИСК — это транс-дифференцировка существующих, терминально дифференцированных клеток (протоковый эпителий, ацинарные или островковые не синтезирующие инсулин клетки) через двойную гормон-позитивную промежуточную клетку [179] либо через процесс дедифференцировки в более примитивные переходные клетки с последующей дифференцировкой в ИСК [132]. Возможность этого процесса подтверждается тесной взаимосвязью эмбрионального развития эндокринных клеток различных типов и наличием эндокриноцитов смешанной секреции как во

время эмбрионального развития [111, 145], так и у взрослого организма [127, 179]. Это отражает выраженную морфогенетическую пластичность тканей поджелудочной железы.

α -клетки более устойчивы к метаболическому стрессу, чем β -клетки, и их количество существенно не меняется у пациентов с сахарным диабетом [127]. Более того, предполагают, что в условиях естественного гомеостаза имеет место трансформация α -клеток в β -клетки. В результате этого формируются незрелые инсулин-продуцирующие клетки, лишенные GLUT2 (1-2% от общего количества β -клеток). Такие инсулин-продуцирующие клетки представляют собой промежуточную стадию перехода α -клеток в β -клетки или наоборот [183]. Легкость, с которой происходит такой переход, объясняется тем, что согласно эпигеномному анализу α -клетки обладают признаками недифференцированной, мультипотентной клетки [179].

δ -клетки также способны транс-дифференцироваться в ИСК в результате эктопической экспрессии Pax4, этот процесс происходит и в физиологических условиях для поддержания популяции β -клеток [99].

Ацинарные клетки являются основным компонентом ткани поджелудочной железы взрослых и благодаря своему обилию они представляют собой привлекательный пул для замещения β -клеток в условиях патологии [155]. Существуют сообщения о стимуляции транс-дифференцировки ацинарных клеток в β -клетки *in vitro* и *in vivo* с помощью введения сигнальных факторов и факторов роста [43]. Однако, несмотря на качественно сходные свойства этих новообразованных инсулин-секретирующих клеток с нативными β -клетками, они содержат низкие концентрации инсулина [169].

Еще одним источником перепрограммированных ИСК могут стать клетки протоков. Известно, что на этапе эмбрионального развития именно эти клетки являются источником неогенеза β -клеток [170]. Также существуют данные об их транс-дифференцировке в ИСК в условиях *in vitro* [167].

В ходе исследования влияния различных транскрипционных факторов на дифференцировку и транс-дифференцировку эндокринных клеток было показано,

что отдельные линии клеток имеют различную способность к трансдифференцировке в другие линии. Было показано, что α -клетки в соответствующих условиях могут легко и быстро подвергаться переходу в β -клетки, в то время как β -клетки в условиях стресса способны трансформироваться в α -клетки [155]. При этом эффективность ацинарного перепрограммирования значительно снижается при воспалении поджелудочной железы или в условиях гипергликемии [68].

Исходя из этого, выявляющиеся одиночные и/или агрегированные клетки смешанного эндокринно-экзокринного происхождения в составе протокового и ацинарного эпителия поджелудочной железы или смешанные эндокриноциты островка рассматриваются в качестве промежуточного состояния такой трансдифференцировки.

1.3.3 – Роль микроокружения в регуляции регенераторных процессов инсулин-синтезирующих структур

Решающее значение в регуляции регенерации инсулин-синтезирующих структур принадлежит их микроокружению. Так, эндотелиальные клетки островков способны изменять эндокринную функцию и рост островка у взрослого организма. Они усиливают секрецию инсулина через взаимодействие с интегрином $\alpha 1\beta 1$ на β -клетках, стимулируют рост β -клеток посредством гепатоцитарного фактора роста (HGF) [151].

Ацинарные клетки также способны оказывать стимулирующее влияние на рост и регенерацию панкреатического островка через продукцию регенерирующего белка I α (REG I α), секреция которого повышается в условиях воспаления [34, 35]. Базальная секреция трипсина ацинарными клетками вокруг островков может способствовать расщеплению белков внеклеточного матрикса (ECM) капсулы островка и способствовать увеличению его размера в условиях повышенной метаболической нагрузки [89].

Гетерогенность инсулин-синтезирующих структур связана с особенностями их микроокружения, при этом они оказывают взаимное влияние друг на друга.

Одну из ведущих ролей в создании этой специфичности микроокружения ИСК различной локализации играют резидентные макрофаги, поскольку доказано, что они участвуют в координации развития, созревания и функции ИСК. Исходя из этого, можно предположить, что резидентные макрофаги будут также осуществлять регуляцию восстановительных процессов инсулин-синтезирующей системы.

Макрофагальная регуляция регенерации

Регенерация поджелудочной железы является результатом скоординированного взаимодействия регенеративных сигналов микроокружения на ее клетки. Хорошо известно, что макрофаги реагируют на сигналы окружающей среды (патогены и их продукты, а также апоптотические клетки) приобретением различных функциональных фенотипов (от классической M1 до альтернативной M2 активации) [166]. Провоспалительные макрофаги M1 действуют как мусорщики, элиминируя патогены и/или поврежденные (измененные) клетки организма, а противовоспалительные макрофаги M2 способствуют индукции толерантности к аутоантигенам, а также репарации и регенерации [75].

В условиях повреждения в островке наряду с провоспалительными макрофагами присутствуют и регуляторные M2 макрофаги, активированные повышенным фагоцитозом разрушенных β -клеток в комбинации с иммунными комплексами. В норме, по мере развития воспаления их соотношение смещается в сторону увеличения количества последних [73]. Такое постепенное, но отчетливое переключение с фенотипа M1 на M2 во время перехода от ранней к средней стадии регенерации поджелудочной железы будет определять успешность процесса регенерации [75].

Влияние альтернативно активированных макрофагов на регенерацию островка в условиях патологии определяется факторами, которые они секретируют [60, 75, 189, 192]. А именно, высокий уровень противовоспалительных цитокинов (ИЛ-10, TGF- β) и глюкокортикоидов, а также провоспалительные цитокины (TNF α , IL-6) и iNOS, способствуют привлечению эозинофилов, регуляторных T-клеток и Th2 иммунному ответу. Фактор роста сосудов (VEGF-C и -D), тромбоцитарный

фактор роста (PDGF), трансформирующий фактор роста (TGF- β), эпидермальный фактор роста (EGF), инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-1) и аргиназа могут содействовать ангиогенезу и репарации тканей [38, 70]. Доказано, что TGF- β , EGF, IGF-1 и PDGF способствуют пролиферации β -клеток и повышению их жизнеспособности [73, 76, 118].

В последнее десятилетие исследования демонстрируют ведущую роль островковых макрофагов в регуляции баланса между эффекторными и регуляторными Т-клетками, от которого зависит развитие аутоиммунной реакции (диабета 1 типа) [166], и в инициации восстановительных процессов [155].

Таким образом, успешность процесса регенерации будет зависеть от способности макрофагов к изменению своего профиля активации и от сигналов их микроокружения. В то же время имеет значение природа гибели клеток (апоптоз или некроз), а также то, вызывает ли повреждение значительный воспалительный ответ, т.е. происходит ли активация цитотоксических Т-лимфоцитов [75].

Резюме

Таким образом, ИСК образуют следующие инсулин-синтезирующие структуры: панкреатический островок и внеостровковые ИСК, которые представлены одиночными клетками в составе ацинарного и протокового эпителия, и их агломератами. В зависимости от своей локализации инсулин-синтезирующие структуры обладают морфофункциональными особенностями. Гетерогенность инсулин-синтезирующих структур прослеживается также и в пределах одной структуры (например, среди панкреатических островков или β -клеток одного островка). Такая гетерогенность морфофункциональных характеристик инсулин-синтезирующих структур закладывается уже в период их эмбрионального развития и определяется условиями их микроокружения. В то же время, они сами оказывают значительное модулирующее влияние на свое микроокружение.

ИСК можно рассматривать в качестве единой инсулин-синтезирующей системы, поскольку они обладают общностью происхождения (первичные протоки

поджелудочной железы) и независимо от своей локализации в равной степени участвуют в формировании общего пула ИСК поджелудочной железы соразмерно метаболической потребности организма как в физиологических условиях, так и при повреждении. Также они осуществляют системную (на уровне организма) и локальную (поджелудочная железа и кишечник) регуляцию обмена веществ и пищеварения в ходе синтеза, секреции и участия в созревании инсулина.

Необходимо отметить, что структура и функция отдельных инсулин-синтезирующих структур достаточно хорошо изучены. Однако, остается много вопросов о механизмах влияния условий их микроокружения (в частности, макрофагов) на их соотношение, синтетическую функцию (морфо-функциональные особенности), а также на чувствительность к повреждению и способность к репарации. Также остается не до конца исследованным вопрос о вкладе отдельных инсулин-синтезирующих структур в поддержание общего количества ИСК, чему и посвящено исследование.

ГЛАВА 2 – МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 – Общая характеристика экспериментальных животных

В качестве экспериментальных животных в исследовании использованы половозрелые самцы крыс Вистар (12-13 недель на момент начала эксперимента) массой 200-250 г.

Животные содержались в условиях вивария Института иммунологии и физиологии УрО РАН с естественной сменой дня и ночи при температуре 22-24°C. Кормление осуществлялось соответственно рациону питания, определенному для лабораторного животного приказом М № 163 от 10.03.1966 г. «О нормах кормления лабораторных животных и продуцентов», комбикормом для лабораторных мышей и крыс Дельта Фидс, ЛБК 120 С-19 (БиоПро, Россия).

Животные имели свободный доступ к пище и воде. Санитарная обработка клеток производилась один раз в день, а дезинфекционные работы осуществлялись еженедельно. В пластиковых клетках, предназначенных для содержания мелких грызунов, содержалось по 5-6 животных. В ходе исследования было использовано 100 животных. Эксперименты на животных выполняли в соответствии с этическими принципами и нормативными документами, рекомендованными Европейским научным фондом (ESF) и Хельсинской декларацией о гуманном отношении к животным (2000 г.), Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (приложение к приказу Минздрава СССР от 12.08.1977 г. № 755) и Федеральным законом РФ «О защите животных от жестокого обращения» от 01.01.1997 г. На проведение исследования было получено разрешение Этического Комитета ИИФ УрО РАН (протокол № 01/21 от 01 декабря 2021 г.).

Патологию инсулин-синтезирующей системы моделировали путем введения животным (N=70) аллоксана в общей дозировке 30мг/100г веса животного. Эти животные были разделены на 2 группы: 1 – крысы без терапии, выводили их из

эксперимента на 3-и (Ал. 3; N=7), 7-е (Ал. 7; N=7), 30-е (Ал. 30; N=16) и 60-е (Ал. 60; N=20) сутки после введения аллоксана; и 2 – с терапией начиная с 30-х суток после введения аллоксана (Ал + АДФН; N=20), выводили их из эксперимента на 60-е сутки после инъекций аллоксана. В качестве контрольных групп служили интактные крысы (интактные; N=20) и крысы, которым осуществляли терапию (АДФН, N=10).

В конце эксперимента после двенадцатичасового голодания наркотизированных (изофуран; Karizoo, Испания) животных взвешивали и производили забор образцов крови из хвостовой вены для определения уровня глюкозы, гликозилированного гемоглобина (HbA1c), инсулина и кортикостерона. Далее крыс выводили из эксперимента передозировкой наркоза, а после проведения срединной лапаротомии изымали поджелудочные железы. Ткань поджелудочной железы исследовали методами морфологического, иммуногистохимического и иммуноферментного анализа.

2.2 – Моделирование патологии инсулин-продуцирующей системы

Для исследования чувствительности структур, синтезирующих инсулин, к повреждению использована экспериментальная модель инсулинозависимого сахарного диабета с использованием химического диабетогена аллоксана (2,4,5,6-тетраоксипиримидин; 5,6-диоксиурацил). При поступлении в организм аллоксан избирательно разрушает инсулин-продуцирующие клетки поджелудочной железы [124]. Это приводит к относительному или абсолютному (в зависимости от дозировки) дефициту инсулина, гипергликемии и гликозурии [96, 107].

Поскольку аллоксан является структурным аналогом глюкозы, поступление его в β -клетки осуществляется через транспортер глюкозы (GLUT-2). Механизм токсического действия аллоксана связан с образованием свободных радикалов в ходе его биотрансформации [173], в присутствии тиолов, особенно глутатиона, он восстанавливается до диалуровой кислоты, при окислении которой образуются активные формы кислорода. Данный процесс имеет циклический характер. β -клетки островков, в отличие от других клеток, содержащих GLUT-2, обладают

слабой антиоксидантной защитой. Вследствие этого, активные радикалы повреждают фермент глюкокиназу, рецепторы GLUT-2 и другие клеточные структуры, что провоцирует нарушение синтеза и секреции инсулина в ответ на глюкозу, а также способствует апоптозу и/или некрозу клетки [129]. В органах и тканях, клетки которых также содержат GLUT-2, но способны отвечать на усиление свободно-радикального окисления активацией ферментов антиокислительной защиты, введение аллоксана не приводит к их выраженному повреждению (печень, почки) [79].

Необходимо отметить, что аллоксан характеризуется низкой стабильностью в разведенном виде, поэтому раствор для инъекций готовят на основе холодной воды непосредственно перед использованием [79]. В качестве альтернативы часто используют химический диабетоген стрептозотоцин (2-Дезокси-2[[[(метилнитрозоамин)карбонил]амино]-Д-глюкопироноза), который, как и аллоксан, является структурным аналогом глюкозы и приводит к избирательной деструкции инсулин-синтезирующих клеток (ИСК), но при этом обладает высокой стабильностью в растворе [169]. Однако неоспоримым преимуществом аллоксана является механизм его токсического действия, который связан с образованием активных форм радикалов, что наблюдается в патогенезе сахарного диабета 1 и 2 типа [129].

Доза, необходимая для индукции деструкции ИСК, зависит от вида животного, способа введения, дозировки и режима питания животного [15]. Аллоксан проявляет свои диабетогенные свойства при парентеральном введении экспериментальным животным: внутривенно, внутрибрюшинно или подкожно. Существует большое количество модификаций аллоксанового диабета, отличающихся дозировкой аллоксана и способом его введения, что отражается на выраженности повреждающего действия [3]. Однако все они имеют существенный недостаток – достаточно высокая летальность экспериментальных животных, минимум 30% [18]. Для моделирования инсулинозависимого сахарного диабета чаще используют однократное внутривенное введение аллоксана крысам в дозе 50-75 мг/кг веса животного. При внутрибрюшинном введении эффективная доза

составляет 350-400 мг/кг веса животного [15]. Поскольку эндогенная глюкоза оказывает протекторное действие, конкурентно связываясь с GLUT2 [166], снизить дозировку препарата, а значит и уровень летальности животных, можно при его введении животным натошак. Также существует рекомендация однократного внутрибрюшинного введения препарата в дозе 200 мг/кг веса крысы, но в этом случае на фоне снижения летальности отмечается потеря стабильности развития гипергликемии, которая может с течением времени нормализоваться [18].

С целью снижения уровня летальности и стабилизации полученных данных в экспериментах с хроническими состояниями нами была разработана собственная модификация экспериментальной модели аллоксанового диабета [8]. А именно, благодаря трехкратному через день внутрибрюшинному введению после 12-часового голодания удалось снизить разовую дозу аллоксана до 10 мг/100г веса животного (общая диабетогенная доза составила 30 мг/100г веса животного) [8, 9].

Таким образом, патологию инсулин-синтезирующей системы моделировали путем трехкратного через сутки интраперитонеального введения крысам аллоксана по 10 мг/100г. Суммарная доза препарата составила 30 мг/100г веса животного. Летальность крыс данной группы составила 15%. Животных выводили из эксперимента на 30-е и 60-е сутки после введения аллоксана передозировкой изофурана.

2.3 – Модулирование функционального состояния системы мононуклеарных фагоцитов

Высказывается предположение, что на морфофункциональные особенности ИСК различной локализации (островковые и внеостровковые клетки) оказывает значительное влияние функциональная активность макрофагов в их микроокружении.

С целью исследования механизмов такого влияния мы модулировали активность системы фагоцитирующих мононуклеаров (СФМ), используя препарат 2-амино-1,2,3,4-тетрагидрофталазин-1,4-дион дигидрата натриевой соли (аминодигидрофталазид натрия, АДФН) [154]. Выбор данного препарата

обусловлен его тропностью к СМФ, обусловленной специфическим взаимодействием с активными формами кислорода в их фагосомах [100, 180], выраженным противовоспалительным и антиоксидантным действием, которое подтверждено многочисленными *in vitro* и *in vivo* исследованиями. Показано, что он снижает секрецию провоспалительных цитокинов (IFN γ , TNF α , IL-6) и активных форм радикалов [1, 100, 114, 180] и повышает продукцию противовоспалительных факторов (IL-10, VEGF) [16, 140] клетками СМФ, а также угнетает апоптоз [74]. Благодаря этим эффектам АДФН способен блокировать системное воспаление и активировать репаративные процессы в экспериментальных моделях распространенного панкреонекроза [17], токсического гепатита [26, 78], острого коронарного синдрома и инфаркта миокарда [164], а также в моделях частичной резекции печени и почек [28, 33].

АДФН вводился внутримышечно в дозе 2 мг/кг массы тела, предварительно разведенным в воде для инъекций один раз каждый день в течение 5 дней, далее 5 раз через день и 5 раз через два дня.

2.2 – Методы исследования

Животных всех экспериментальных групп после двенадцатичасового голодания выводили из эксперимента передозировкой изофураном (Karizoo, Испания). Наркотизированных животных взвешивали и производили забор образцов их крови из хвостовой вены для проведения гематологического (оценка содержания форменных элементов крови), биохимического (измерение содержания глюкозы и гликозилированного гемоглобина (HbA1c)) и иммуноферментного анализа (определение концентрации инсулина, кортикостерона, про- и противовоспалительных цитокинов).

После проведения срединной лапаротомии изымали поджелудочные железы для дальнейшего гистологического исследования инсулин-синтезирующей системы поджелудочной железы в условиях повреждения и влияния модулирования функциональной активности СФМ на морфофункциональные

характеристики ИСК и их пролиферативную и синтетическую активность. Иммуноферментное исследование гомогенатов образцов применяли для оценки уровня про- и противовоспалительных цитокинов в ткани, что отражает функциональное состояние макрофагов поджелудочной железы в условиях эксперимента.

2.2.1 – Исследование гематологических показателей периферической крови экспериментальных животных

Общий анализ периферической крови проводился на гематологическом анализаторе Celly 70 (Biocode-Nucel; Франция), адаптированном для ветеринарных исследований.

Забор крови у крыс осуществлялся из хвостовой вены в специально предназначенные пластиковые пробирки, обработанные гепарином в качестве антикоагулянта. Анализировали следующие параметры:

1. WBC – концентрация лейкоцитов, г/л;
2. PLT – концентрация тромбоцитов, Т/л;
3. LYM – концентрация лимфоцитов, г/л;
4. GRN – концентрация гранулоцитов, г/л;
5. MID – концентрация средних клеток, Т/л;
6. RBC – концентрация эритроцитов, Т/л;
7. HGB – концентрация гемоглобина, г/дл;
8. MCH – среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг;
9. MCHC – средняя концентрация гемоглобина в эритроците, г/дл;
10. HCT – гематокритный показатель, %;
11. PDW – ширина распределения тромбоцитов по объему;
12. RDW – ширина распределения эритроцитов по объему;
13. PCT – тромбокритный показатель, %;
14. MCV – средний объем эритроцитов, фл;
15. MPV – средний объем тромбоцитов, фл;
16. LYM% – процентное содержание лимфоцитов;

17. MID% – эозинофилы, базофилы, моноциты;

18. GRN% – процентное содержание гранулоцитов.

2.2.2 – Исследование периферической крови экспериментальных животных

Биохимические методы исследования

Определение концентрации глюкозы. Концентрация глюкозы в периферической крови в физиологических условиях поддерживается в жестких пределах от 5,05 до 6,88 ммоль/л (в сыворотке крови крыс) [28], а изменение этого показателя является одним из диагностических показателей нарушения в системе регуляции углеводного обмена [4]. Содержание глюкозы в плазме крови определяли количественным глюкозооксидазным методом с использованием готовых наборов реактивов (Витал диагностикс; Россия). Метод определения основан на том, что в результате окисления глюкозы на воздухе в присутствии глюкозооксидазы образуется перекись водорода. Последняя при взаимодействии с 4-аминоантипирином и фенолом в присутствии пероксидазы образует хинонимин, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации глюкозы в анализируемой пробе [24]. Оптическую плотность исследуемых образцов измеряли на спектрофотометре DU-800 (Beckman Coulter; США) при длине волны света 510 нм, в качестве единиц измерения использовали миллимоль на литр (ммоль/л).

Определение степени гликозилирования гемоглобина. Гликозилированный гемоглобин образуется в результате неферментативного взаимодействия гемоглобина А с глюкозой, и его доля пропорциональна концентрации глюкозы в межклеточной среде эритроцитов. Увеличение доли гликозилирования гемоглобина на фоне повышения уровня глюкозы в крови свидетельствует о наличии хронической гипергликемии [62]. В то же время повышение концентрации глюкозы может быть кратковременным как результат стресса при манипуляциях с животным. Степень гликозилирования гемоглобина (HbA1c) определяли в гемолизате цельной крови методом гель-хроматографии по готовому набору

реактивов «Диабет-тест» (Фосфосорб, Россия). Данный метод включает в себя следующие этапы:

1) отделение гликозилированного гемоглобина от негликозилированной фракции в результате связывания с сорбентом (содержит 3-аминофенилборную кислоту);

2) полная элюция гликозилированной фракции за счёт вытеснения сорбента сорбитолом;

3) измерение оптической плотности обеих фракций с помощью спектрофотометра DU-800 (Beckman Coulter, США) при длине волны света 414 нм [24]. На основании этого рассчитывалось относительное содержание гликозилированного гемоглобина в анализируемой пробе в процентах от общего его количества.

Исследование крови методом иммуноферментного анализа.

Определение содержания гормонов (инсулина, кортикостерона) и про-, противовоспалительных факторов (фактора роста опухоли альфа (TNF α), интерферона гамма (IFN γ), интерлейкина 1 α , 6 и 10 (IL-1 α , IL-6 и IL-10), инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1)) в плазме крови экспериментальных животных производили сэндвич-методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием стандартных наборов по протоколу производителя (*таблица 1*).

Забор образцов периферической крови осуществляли у предварительно наркотизированных экспериментальных животных из хвостовой вены в специально предназначенные пластиковые пробирки, обработанные гепарином в качестве антикоагулянта. Затем полученные образцы центрифугировали с использованием Sigma 3K30 (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Германия) в течение 15 минут при +4°C на скорости 5000 оборотов в минуту. Полученный супернатант распределяли по 200 мкл в пробирки типа «Эппендорф», замораживали и хранили до момента анализа при -80°C. Плазму для анализа размораживали непосредственно перед проведением ИФА.

Таблица 1 – Перечень наборов реагентов для проведения иммуноферментного анализа, использованных в работе

Определяемое вещество	Название набора, производитель, страна производства
Инсулин	Rat Insulin ELISA Kit, Invitrogen-Thermo Fisher Scientific, США
Кортикостерон	Corticosterone ELISA Kit, Abcam, Великобритания
TNF α	TNF alpha Rat ELISA Kit, Invitrogen-Thermo Fisher Scientific, США
IFN γ	IFN gamma Rat ELISA Kit, Invitrogen-Thermo Fisher Scientific, США
IL-1 α	Rat IL-1 alpha Platinum ELISA BMS627/ BMS627TEN, Invitrogen-Thermo Fisher Scientific, США
IL-6	Rat IL-6 ELISA Kit BMS625/ BMS625 TWO / BMS625 TEN, Invitrogen-Thermo Fisher Scientific, США
IL-10	Rat IL-10 ab100764, abcame, США
IGF-1	Rat IGF-1 ELISA Kit BMS629/BMS629 TEN, Invitrogen-Thermo Fisher Scientific, США

Иммуноферментный анализ (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) представляет собой лабораторный иммунологический метод выявления антигенов в исследуемом образце, в основе которого лежит образование комплекса «антиген – антитело» [21]. Исследование проводилось с использованием автоматизированного прибора Lazurite Automated Elisa System (Dynex Technologies Inc., США). Результаты измерения концентрации исследуемых веществ представлены в пг/мл плазмы крови.

2.2.3 – Морфофункциональное исследование инсулин-синтезирующей системы поджелудочной железы крыс

После извлечения поджелудочной железы ее взвешивали и рассчитывали коэффициент массы органа как отношение его массы в миллиграммах на 100 грамм общего веса животного. Кроме того, навеску органа высушивали в духовом шкафу для оценки соотношения сухого вещества и воды в ткани.

В ходе гистологического исследования образцы поджелудочной железы экспериментальных животных фиксировались в 10% нейтральном формалине в течение 24 часов при комнатной температуре. Далее осуществлялась стандартная

проводка материала с использованием автоматической системы проводки биологического материала TP 1020 (Leica; Германия) в течение 12 часов с последующим заключением в парафин. Серийные срезы (толщиной 3-4 мкм) монтировались в водяной бане (36°C) на стекла с адгезивным покрытием Superfrost Plus (Thermo Scientific, США) и высушивались в вертикальном положении в течение ночи.

Для осуществления морфологического исследования структуры ткани срезы после депарафинирования и регидратации были окрашены гематоксилином и эозином по общепринятой методике [20]. В ходе морфометрического анализа структуры поджелудочной железы определяли количество панкреатических островков (в 1 мм² паренхимы), их площадь (в мкм²) и плотность клеток в них (в расчете на 1 мм² островка).

Иммуногистохимическое окрашивание

Иммуногистохимическое окрашивание применялось для идентификации, а также подсчета абсолютного (в 1 мм² островка / среза органа) и относительного количества (%) ИСК (insulin+), локализованных в панкреатических островках, агломератах или в виде одиночных ИСК, в составе ацинарного эпителия или в перидуктальной области, и тканевых макрофагов (CD-68+) различной локализации (рисунок 6).

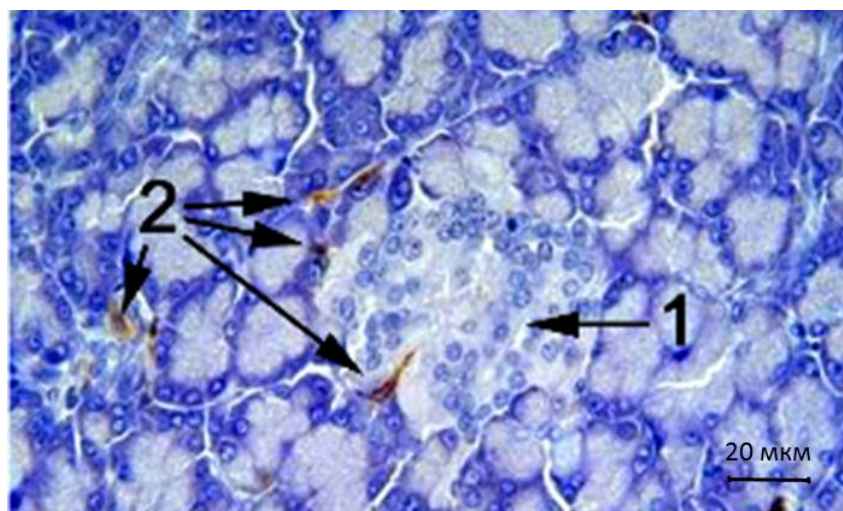


Рисунок 6 – Иммуногистохимическое окрашивание на маркер макрофагов CD-68 поджелудочной железы крысы на 60-е сутки после введения аллоксана
Примечание: 1 – панкреатический островок, 2– макрофаги (CD-68+).

В качестве агломератов ИСК принимали скопления от 2 до 5 ИСК, не ограниченных капсулой из базальной мембраны, как это имеет место у панкреатического островка (ПО) [56] (Рисунок 7). С целью стандартизации данных эти показатели представлены в расчете на единицу площади (1 мм^2) ПО или среза ткани, в зависимости от показателя. Во всех ИСК рассчитывали площадь ядра, цитоплазмы (мкм^2) и ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО).

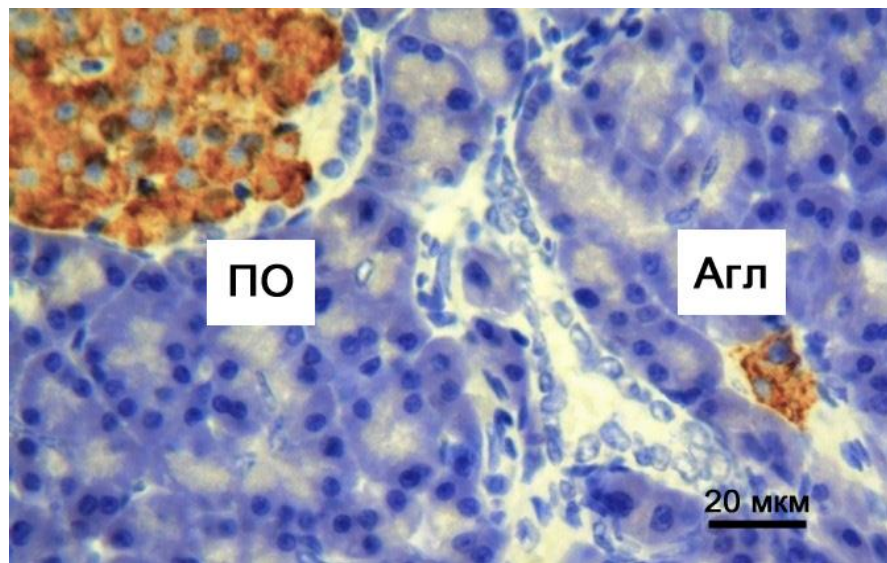


Рисунок 7 – Иммуногистохимическое окрашивание препарата поджелудочной железы интактного животного на инсулин

Примечание: ПО – панкреатический островок, Агл – агломерат инсулин-синтезирующих клеток в составе протокового эпителия.

В ходе исследования применяли непрямой пероксидазный метод окрашивания [124]. Для проведения иммуногистохимического исследования (ИГХ) образцов после высушивания срезы подвергали депарафинизации, дегидратации и промывке в фосфатно-солевом буфере с Tween 20 (PBS) (PanReas AppliChem GmbH, Германия), при $\text{pH}=7,6$. Далее осуществляли демаскирующее восстановление антигенов (CD68+) путем кипячения в течение 15 мин. в цитратном буфере ($\text{pH}=6,0$). Для предотвращения фонового окрашивания проводили блокировку активности эндогенной пероксидазы путём инкубации срезов в 3% растворе пероксида водорода в течение 5 минут и, после промывки, в протеиновом

блоке (на основе бычьего сывороточного альбумина) в течение 30 минут при комнатной температуре.

На следующем этапе проводилась инкубация срезов с первичными антителами к инсулину (clone E11D7; Millipore, Германия; 1:200) или пан-макрофагальному CD68 (BD, США; 1:100) в течение 60 мин. на водяной бане при 37°C с последующей отмывкой не связавшихся антител в PBS. Далее проводилось нанесение вторичных антител (Biotin Goat Anti-Mouse Ig; BD, США; 1:50) в течение 30 минут при 37°C с последующей отмывкой в PBS.

Далее проводили маркировку связавшегося комплекса «антиген - первичное антитело – вторичное антитело», для этого срезы инкубировали с стрептавидин-пероксидазой хрена (SAV-HRP) во влажной камере при 37°C в течение 30 минут. Визуализировали антигенреактивные клетки, используя тест-систему Novolink TM Polymer Detection System (Novocastra Lab. Ltd., Великобритания), включающую хромогенный субстрат 3,3-диаминобензидин (DAB) в забуференном растворе. После окрашивания DAB (5 минут) срезы промывали в дистиллированной воде 5 минут, ядра докрашивали гематоксилином (7 минут) с последующим обезвоживанием в спиртах, просветлением в ксилоле и заключением препаратов под покровные стекла с использованием монтирующей среды Shandon Consul-Mount (Thermo Scientific, США).

DAB-позитивные клетки идентифицировали по коричневому окрашиванию. Для исключения ложно-позитивной реакции проводили негативный контроль окрашивания [124].

Двойное иммуногистохимическое окрашивание

Двойное иммуногистохимическое исследование применялось для визуализации и оценки синтетической, пролиферативной активности (insulin+Ki-67+) и интенсивности апоптоза ИСК (insulin+TUNEL+) различной локализации и распределение макрофагов в островках с различным содержанием инсулина.

Пролиферацию ИСК (рисунк 8) различной локализации (ПО и внеостровковые) выявляли путем двойного иммунофлуоресцентного мечения последовательным методом [124]. На первом этапе осуществляли демаскировку в

цитратном буфере (pH=6,0) в течение 15 мин. в микроволновой печи с последующим остыванием. Далее после отмывки демаскирующего буфера проводили этап иммуномечения маркера пролиферации Ki-67 крысы. Инкубацию с первичными мышинными антителами к Ki-67 (BD, США; 1:150) проводили во влажной камере при 4°C в течение ночи. После отмывки в PBS осуществляли инкубацию со вторичными иммуноглобулинами козы против иммуноглобулинов мыши конъюгированными с Texas Red (Abcam, США; 1:100) во влажной камере при 37°C, в темноте (как и все последующие этапы окрашивания во избежание выгорания флуорофоров) в течение 40 минут. На третьем этапе после отмывки в PBS осуществляли иммуномечение инсулина с использованием мышинных первичных антител к инсулину крысы (clone E11D7; Millipore, Германия; 1:200). Антитела инкубировали 1,5 часа во влажной камере при 37°C с последующей отмывкой в PBS и инкубацией со вторичными иммуноглобулинами козы против иммуноглобулинов мыши, конъюгированных с Alexa Flore 488 (Abcam, США; 1:100) в течение 40 минут при 37°C во влажной камере. Контрастное окрашивание ядер проводили с помощью NucRed Dead 647 (LifeTec, Germany) в течение 10 минут во влажной камере, защищенной от света.

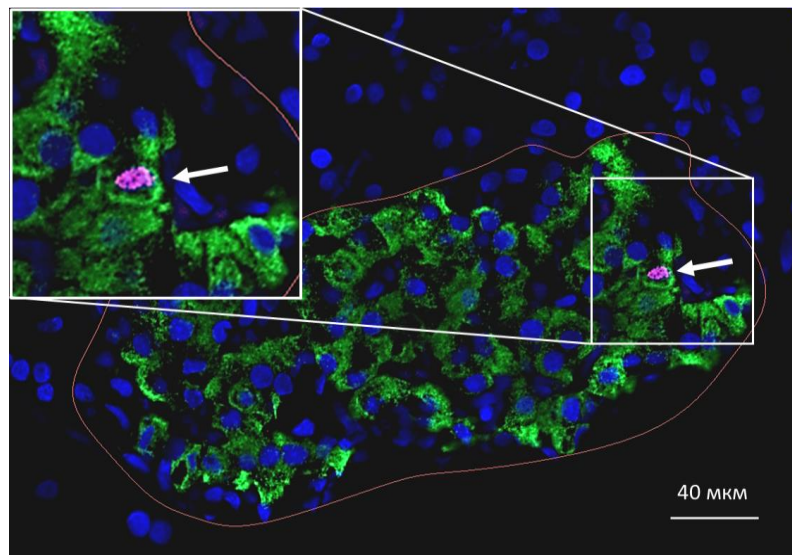


Рисунок 8 – Двойное иммуногистохимическое окрашивание пролиферирующей β -клетки (Ki-67 + инсулин) панкреатического островка интактной крысы

Примечание: стрелкой указана пролиферирующая β -клетка; зеленое – инсулин; синие – ядра; розовое – маркер пролиферации Ki-67.

Оценку апоптоза ИСК (рисунок 9) осуществляли путем выявления фрагментации ДНК методом TUNEL с использованием набора реагентов Thermo Fisher (США) с последующим иммунофлуоресцентным мечением инсулина путем инкубации с первичными антителами к инсулину (clone E11D7; Millipore, Германия; 1:200) в темноте в течение 1,5 часов при 37°C в влажной камере и далее с инкубацией со вторичными антителами козы против мыши конъюгированными с Alexa Flore 488 (Abcam, США; 1:100) в течение 40 минут при 37°C также в темноте.

Распределение макрофагов (рисунок 10) в различных островках визуализировали также в ходе двойного непрямого последовательного иммунофлуоресцентного окрашивания, как было описано выше [120], используя антитела к пан-макрофагальному антигену CD-68 (BD, США; 1:100) и инсулину (Millipore, Германия; 1:100), вторичные антитела были конъюгированы с Texas Red (Abcam, США; 1:100) и Alexa Flore 488 (Abcam, США; 1:100) соответственно.

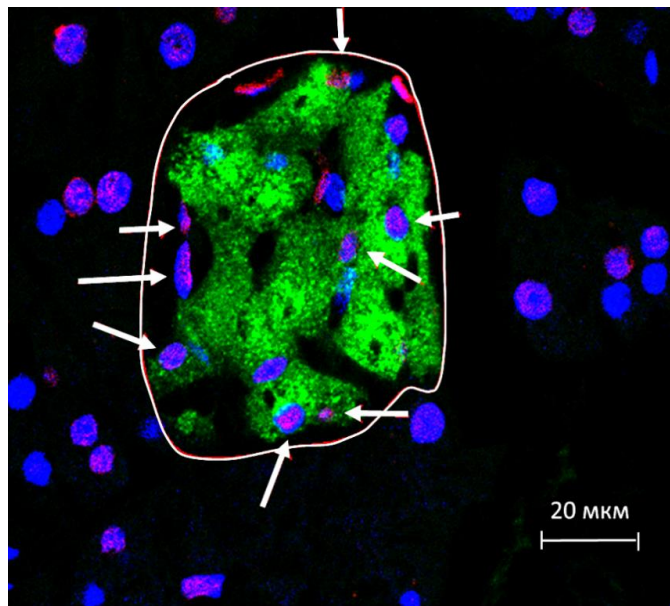


Рисунок 9 – Двойное иммуногистохимическое окрашивание апоптозирующей β -клетки (TUNEL + инсулин) панкреатического островка крысы на 30-е сутки после введения аллоксана

Примечание: стрелками указаны клетки, вступившие в апоптоз; зеленое – инсулин; синие – ядра; розовое – маркер фрагментации ДНК (TUNEL).

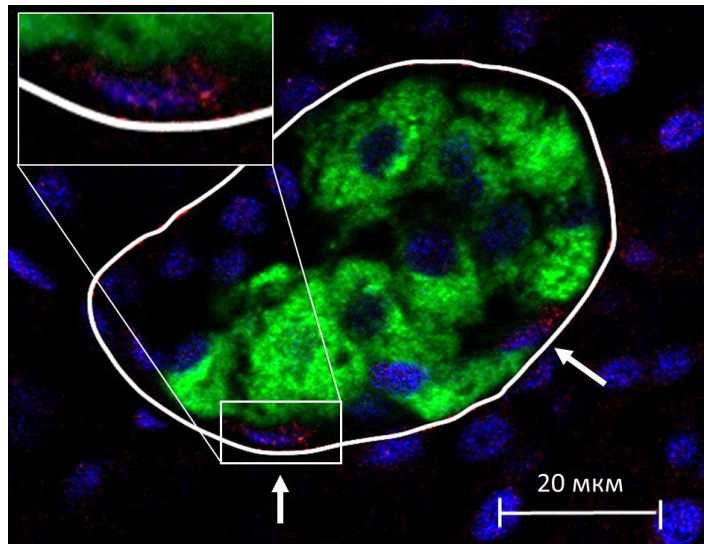


Рисунок 10 – Двойное иммуногистохимическое окрашивание макрофагов (CD-68) и β -клеток (инсулин) панкреатического островка крысы на 30-е сутки после введения аллоксана

Примечание: стрелками указаны макрофаги; зеленое – инсулин; синие – ядра; красное – пан-макрофагальный маркер CD-68.

Негативный контроль окрашивания производили на аналогичных срезах поджелудочной железы по соответствующим протоколам, исключая первичные антитела [124, 168].

Перечень всех использованных антител в ходе иммуногистохимического окрашивания представлен в *таблице 2*.

Конфокальное исследование образцов поджелудочной железы

Морфологическую структуру образцов поджелудочной железы, предварительно окрашенной двойным иммунофлуоресцентным методом, анализировали на сканирующем лазерном конфокальном микроскопе LSM 710 (CARL ZEISS, Германия), а морфометрический анализ проводили с помощью программного обеспечения ZEN2010. В ходе морфометрического исследования в 1 мм² паренхимы поджелудочной железы (N/мм²) определяли абсолютное (в расчете на единицу площади ПО и/или среза) и относительное (в процентах от общего количества ИСК различной локализации) количество пролиферирующих ИСК (Ki-67+ИСК) и ИСК, вступивших в апоптоз (TUNEL+ИСК), а также их синтетическую активность путем измерения интенсивности флуоресценции инсулин-позитивной области ИСК.

Содержание инсулина в ИСК различной локализации оценивали путем измерения интенсивности флюоресценции инсулин-позитивной области клеток (чем больше инсулина содержит клетка, тем больше антител с ней связывается и тем интенсивнее она флюоресцирует) [67].

Таблица 2 – Перечень примененных антител для иммуногистохимического исследования поджелудочной железы экспериментальных животных

Выявляемый антиген	Первичное антитело: клон, производитель; разведение	Вторичное антитело: клон, производитель; разведение
insulin	Purified Mouse Anti-rat insulin, клон E11D7, Millipore (Германия); 1:200	Goat Anti-Mouse Ig, конъюгированные с Alexa Flore 488, Abcam (США); 1:100. или Biotin Goat Anti-Mouse Ig (Multiple Adsorption), поликлональное, BD Biosciences (США), 1:50
CD68	Purified Mouse Anti-rat CD-68, BD (США); 1:100	Goat Anti-Mouse Ig, конъюгированные с Texas Red (Abcam, США); 1:100. или Biotin Goat Anti-Mouse Ig (Multiple Adsorption), поликлональное, BD Biosciences (США), 1:50
Ki-67	Purified Mouse Anti-Human Ki67, клон В 56, BD Pharmingen (США); 1:150	Goat Anti-Mouse Ig, конъюгированные с Texas Red (Abcam, США); 1:100
Insulin	Purified Mouse Anti-rat insulin, клон E11D7, Millipore (Германия); 1:200	Goat Anti-Mouse Ig, конъюгированные с Alexa Flore 488, Abcam (США); 1:100

В зависимости от интенсивности флюоресценции инсулина все ПО были разделены на три диапазона (типа): I тип – ПО с высоким содержанием инсулина (интенсивность флюоресценции инсулина от 41 усл. ед.); II тип – ПО со средним содержанием инсулина (интенсивность флюоресценции инсулина от 21 до 40 усл. ед.); III тип – ПО с низким содержанием инсулина (интенсивность флюоресценции до 20 усл. ед.). Данные диапазоны были выделены у интактных животных и далее

оценивалось смещение долей ПО, наблюдаемых в этих трех диапазонах (типов ОП), в зависимости от воздействия.

Иммуноферментное исследование ткани поджелудочной железы экспериментальных животных

С помощью твёрдофазного иммуноферментного анализа сэндвич-методом (ИФА) определяли содержание фактора роста опухоли альфа (TNF α), интерферона гамма (IFN γ), интерлейкина 1 α , 6 и 10 (IL-1 α , IL-6 и IL-10), инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1) в гомогенате поджелудочной железы (*таблица 2*).

Образцы поджелудочной железы промывали в физиологическом растворе. Затем ткань помещали в фосфатно-солевой буфер с pH=7,4 (PBS) (Эко-Сервис, Россия) из расчёта 1 мл на 1 мг ткани и гомогенизировали с помощью автоматизированной системы для гомогенизации тканей BD Medimachine (BD Bioscience, США). В целях предотвращения протеолиза процедуру проводили на льду. Полученный экстракт ткани поджелудочной железы центрифугировали с помощью Sigma 3K30 (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Германия) в течение 30 минут при 15000 оборотах в минуту при температуре +4°C [128]. Полученный супернатант собирали, разводили в 2 раза PBS, разливали в эппендорфы по 200 мкл и хранили при температуре -80°C вплоть до момента проведения исследования.

Исследование проводилось с использованием автоматизированного прибора Lazurite Automated Elisa System (Dynex Technologies Inc., США) и стандартизованных наборов, по протоколам производителя (*таблица 2*). Результаты измерения концентрации исследуемых веществ представлены в пг/мл гомогената поджелудочной железы.

2.3 – Статистические методы обработки экспериментальных данных

Полученные данные анализировали с помощью программы STATISTICA 10. Данные представлены в виде арифметического среднего \pm ошибка среднего ($M \pm m$). Достоверность различий между группами оценивали по непараметрическому критерию Краскела-Уоллеса для множественных сравнений (непараметрический метод сравнения трех или более независимых групп). Данный статистический

подход был выбран в связи с отсутствием нормального распределения данных в исследуемых выборках. Корреляционные связи выявляли путем определения коэффициента корреляции Спирмена (R). Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Список статей, опубликованных по результатам главы 2

1. Токсическое действие аллоксана в динамике развития аллоксанового диабета / С.Ю. Медведева, **Т.С. Булавинцева**, И.Г. Данилова, И.Ф. Гетте, В.Г. Сенцов // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2012. – № 3. – С. 30-33. (ИФ РИНЦ - 0.225).

2. Способ моделирования аллоксанового диабета: патент на изобретение RU 2534411 С1, Российская Федерация / Данилова И.Г., Гетте И.Ф., Булавинцева Т.С.; патентообладатели: Данилова И.Г., Гетте И.Ф.; Институт иммунологии и физиологии УрО РАН. Дата рег. 04.06.2013., дата публикации 27.11.2014 // Бюлл. - 2014. - № 33.

ГЛАВА 3 – МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИНСУЛИН-СИНТЕЗИРУЮЩЕЙ СИСТЕМЫ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ

В ходе проведенного исследования установлено, что поджелудочная железа интактных крыс соответствует анатомической и гистологической норме (таблица 3).

Таблица 3 – Общая морфологическая характеристика поджелудочной железы

Масса поджелудочной железы (мг)	Коэффициент массы (мг/100г)	Сухая масса (%)
686 ± 49	172 ± 12	29 ± 1

Инсулин-синтезирующая система (рисунок 11) представлена β -клетками островков Лангерганса и внеостровковыми ИСК, которые соответственно составляли 98% и 2,5% от общего количества инсулин-синтезирующих клеток паренхимы поджелудочной железы (таблица 4). Внеостровковые ИСК располагались в составе ацинарного и/или протокового эпителия в виде одиночных клеток, или были сконцентрированы в клеточные агломераты (рисунок 11 Б,В,Г). ИСК образовали соответствующие структуры (панкреатические островки, одиночные ИСК и их агломераты).

Наибольшую долю от общего количества структур в 1 мм^2 площади паренхимы поджелудочной железы занимали панкреатические островки (63%), а на агломераты и одиночные клетки приходилось по $<20\%$ соответственно (рисунок 12). При этом соотношение панкреатических островков к внеостровковым инсулин-синтезирующим структурам составляло 1,5 : 1.

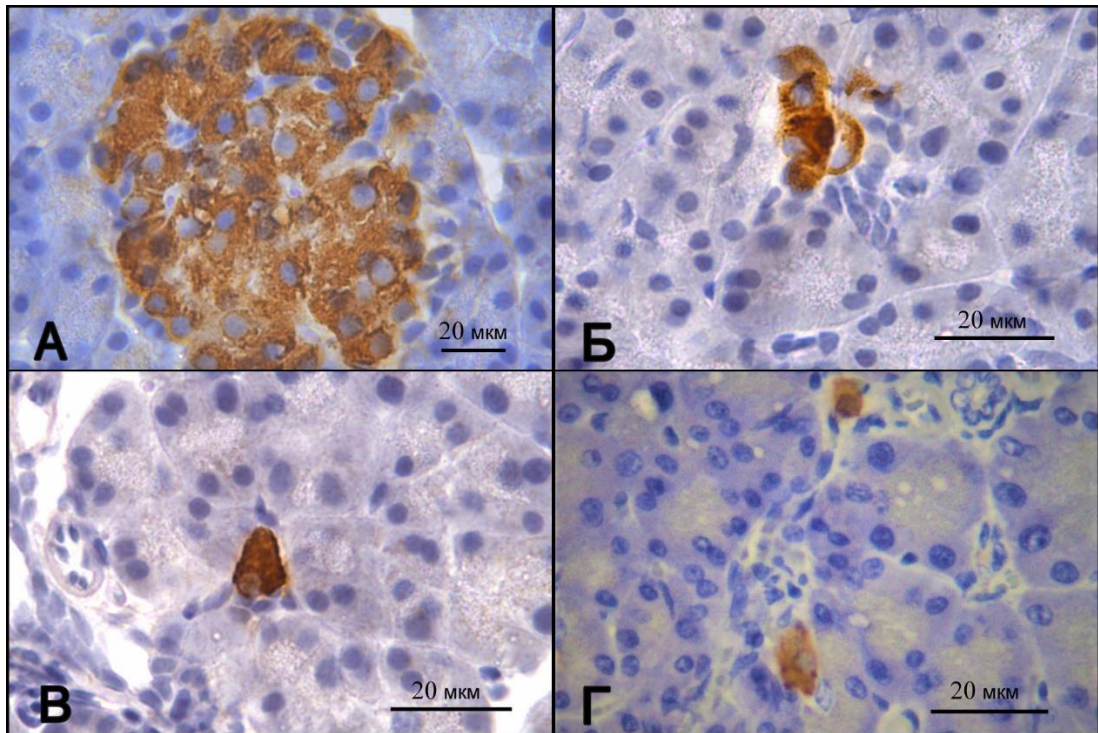


Рисунок 11 – Инсулин-синтезирующие структуры поджелудочной железы интактного животного

Примечание: ИГХ на инсулин (коричневый). А – Панкреатический островок; Б – Агломерат ИСК; В – одиночная ИСК в составе ацинарного эпителия; Г – одиночные ИСК в составе протокового эпителия. ИГХ окрашивание на инсулин (Anti-Insulin, clone E11D7, Millipore Corporation).

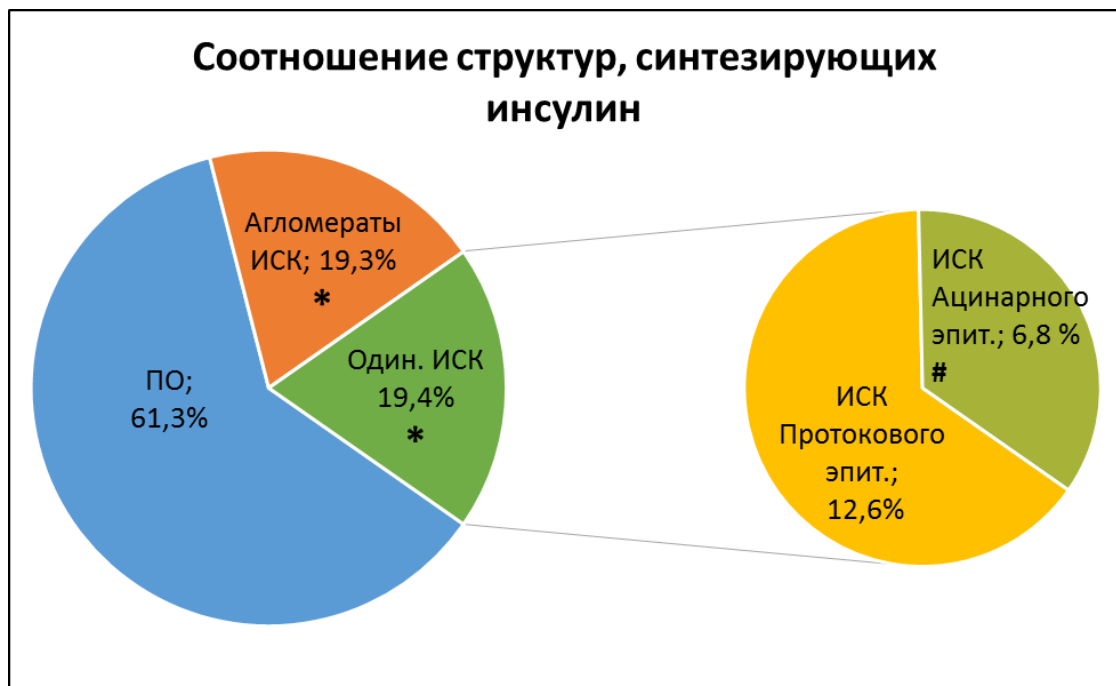


Рисунок 12 – Соотношение инсулин-синтезирующих структур в паренхиме поджелудочной железы интактных животных

Примечание: ПО – панкреатические островки. * – достоверные отличия с ПО ($P \leq 0,05$); # – с перидуктальной частью ($P \leq 0,05$).

Таблица 4 – Морфофункциональные характеристики инсулин-синтезирующих клеток различной локализации в поджелудочной железе

Показатель	Панкреатический островок	Агломераты	Одиночные ИСК		
			Средние значения	Ацинусы	Перидуктальная область
Количество ИСК в 1мм ² паренхимы	107,1 ± 10,5	1,8 ± 0,3 *	0,64 ± 0,06 *	0,42 ± 0,06 * #	0,22 ± 0,03 * # \$
Доля ИСК от общего количества ИСК, %	97,8 ± 0,3	1,7 ± 0,3 *	0,63 ± 0,10 *	0,37 ± 0,07 * #	0,19 ± 0,03 * # \$
Интенсивность флюоресценции инсулина ИСК, отн. ед.	33,7 ± 1,7	38,0 ± 4,3	35,1 ± 4,2	42,7 ± 3,3 *	29,6 ± 2,4 \$
Площадь цитоплазмы, мкм ²	48,6 ± 3,4	47,7 ± 5,7	75,6 ± 6,0 *#	88,0 ± 7,1 * #	60,9 ± 6,1 \$
Площадь ядра, мкм ²	24,5 ± 0,6	25,6 ± 1,0	24,4 ± 1,8	24,2 ± 0,9	23,1 ± 2,6
ЯЦО ИСК	0,52 ± 0,03	0,58 ± 0,08	0,33 ± 0,03 *#	0,30 ± 0,02 * #	0,47 ± 0,07 \$
TUNEL ⁺ insulin ⁺ в 1мм ² паренхимы	0,78 ± 0,19	0,07 ± 0,01 *	0,02 ± 0,01 *	0	0,04 ± 0,01 * # \$
Доля TUNEL ⁺ insulin ⁺ от общего количества ИСК в структуре, %	0,64 ± 0,13	11,7 ± 1,2 *	8,3 ± 1,2 *	0	14,9 ± 2,2 * # \$
Ki-67 ⁺ insulin ⁺ в 1мм ² паренхимы	0,86 ± 0,14	0	0	0	0
Доля Ki-67 ⁺ insulin ⁺ от общего количества ИСК, %	0,68 ± 0,06	0	0	0	0

Примечание: ИСК – инсулин-синтезирующая клетка; ЯЦО – ядерно-цитоплазматическое отношение. Статистически значимые отличия между структурами, синтезирующими инсулин (P≤0,05): * – от значений панкреатического островка, # – от значений агломерата, \$ – от значений одиночных ИСК ацинарного эпителия (P≤0,05).

3.1 – Панкреатические островки

β -клетки панкреатического островка крысы располагались ближе к его центру, форма их чаще округлая (*рисунок 11 А*). Ядро клетки овальной формы располагалось ассиметрично, смещено к полюсу клетки, обращенному в противоположную сторону от капилляра, и занимало примерно 34% от общего объема клетки (*таблица 5*).

Согласно морфометрическому исследованию, ИСК различной локализации обладали одинаковыми размерами ядра, однако β -клетки островков обладали меньшими размерами цитоплазмы и интенсивностью флюоресценции инсулин-позитивной области в сравнении с одиночными ИСК (*таблица 4*).

Пролиферирующие ИСК ($Ki-67^{+}insulin^{+}$) определялись только в составе островков Лангерганса (*таблица 4*). Исследование уровня апоптоза свидетельствовало, что наибольшее количество апоптотирующих ИСК паренхимы поджелудочной железы расположено в островках. Однако доля апоптотирующих клеток от общего их количества в структуре являлась наименьшей в сравнении с другими структурами.

Несмотря на сходные показатели общего количества клеток, содержания макрофагов и β -клеток, а также размеров ядра и цитоплазмы β -клеток, островки обладали значительной гетерогенностью содержания инсулина в β -клетках и соотношения их пролиферации и апоптоза (*таблица 5*), что являлось основой для выделения различных их типов.

В данном исследовании панкреатические островки разделены в зависимости от содержания инсулина в β -клетках (определяли путем измерения интенсивности флюоресценции инсулин-позитивной области клеток натошак). Основное количество островков характеризовалось высокой (I тип) и средней (II тип) интенсивностью флюоресценции инсулина в их β -клетках (36,5 % и 49,6% соответственно), доля островков с низкой интенсивностью флюоресценции инсулина (III тип) составляла 13,9% от их общего количества (*таблица 5*).

Таблица 5 – Характеристика панкреатических островков интактных животных с различной функциональной активностью

Показатель	I тип (от 41 усл. ед.)	II тип (21 - 40 усл. ед.)	III тип (до 20 усл. ед.)
Доля от общего количества (%)	37 ± 3	50 ± 3	14 ± 2 * #
Характеристика островка			
Диаметр ПО (мкм)	54 ± 4	73 ± 6 *	74 ± 6 *
Общая плотность клеток ПО / мм ² ПО	10 978 ± 431	11 064 ± 407	10 912 ± 828
Количество β-клеток / мм ² ПО	6 800 ± 229	6 732 ± 232	7 511 ± 438
Доля β-клеток от общего количества клеток (%)	60 ± 3	59 ± 2	66 ± 2
Количество макрофагов /мм ² структуры	25,3 ± 4,4	28,6 ± 5,5	38,6 ± 6,2
Доля макрофагов от всех клеток (%)	0,24 ± 0,05	0,27 ± 0,06	0,50 ± 0,13
Характеристика β-клеток			
Площадь ядра β-клеток (мкм ²)	22,6 ± 1,2	24,9 ± 0,6	24,4 ± 0,9
Площадь цитоплазмы β-клеток (мкм ²)	44,3 ± 4,3	43,7 ± 3,7	41,7 ± 2,3
ЯЦО β-клеток	0,53 ± 0,03	0,60 ± 0,04	0,58 ± 0,04
Пролиферация			
Количество Ki-67 ⁺ β-клеток /мм ² ПО	65 ± 5	37 ± 3 *	21 ± 3 * #
Доля Ki-67 ⁺ β-клеток от всех β-клеток (%)	0,80 ± 0,1	0,49 ± 0,03 *	0,31 ± 0,01 * #
Апоптоз			
Количество TUNEL ⁺ β-клеток /мм ² ПО	73 ± 4	42 ± 5 *	71 ± 7
Доля TUNEL ⁺ β-клеток, % от всех β-клеток	1,1 ± 0,1	0,6 ± 0,1 *	0,9 ± 0,1
Ki-67 ⁺ β-клеток / TUNEL ⁺ β-клеток	0,9 ± 0,1	1,1 ± 0,2	0,3 ± 0,1 * #

Примечание: ПО – панкреатический островок; статистически значимые отличия между панкреатическими островками различных типов (P≤0,05): * – достоверные различия с островками I типа (P≤0,05); # – достоверные различия с островками II типа (P≤0,05).

Панкреатические островки I типа (с высоким уровнем флюоресценции инсулина, от 41 усл. ед.) характеризовались минимальными размерами, высоким уровнем пролиферации ($Ki-67^+$ insulin⁺) и апоптоза (TUNEL⁺ insulin⁺) β -клеток, при этом их отношение равно единице (*таблица 5*).

ПО II типа (со средним уровнем флюоресценции инсулина, 21-40 усл. ед.) обладали средним количеством пролиферирующих β -клеток ($Ki-67^+$ insulin⁺) и низким уровнем апоптоза β -клеток, соотношение этих процессов также равнялось единице (*таблица 5*).

ПО III типа (с низким уровнем флюоресценции инсулина, до 20 усл. ед.) занимали наименьшую долю от общего количества островков и содержали наибольшее относительное количество макрофагов. При этом в них выявлялось наименьшее количество пролиферирующих ($Ki-67^+$ insulin⁺) и выраженное преобладание уровня апоптотирующих β -клеток, в результате чего отношение двух процессов сильно смещено в сторону последнего (*таблица 5*).

Корреляционный анализ свидетельствовал о наличии прямой зависимости количества $Ki-67^+$ β -клеток от интенсивности флюоресценции инсулин-позитивной области их островков (Крэффицент Спирмена $R=0,91$ при $P=0,001$), т.е. чем выше среднее содержание инсулина в β -клетках островков, тем больше их пролиферативная активность. При этом корреляция между интенсивностью флюоресценции инсулин-позитивной области островков и уровнем апоптоза β -клеток не выявлялась (Крэффицент Спирмена $R=0,06$ при $P=0,84$).

3.2 – Внеостровковые инсулин-синтезирующие структуры

Внеостровковые ИСК определялись в составе протокового или ацинарного эпителия и были локализованы в непосредственной близости к сосудам микроциркуляторного русла. Морфологическое исследование внеостровковых ИСК свидетельствовало, что одиночные ацино-инсулярные клетки имеют пирамидальную форму, их ядро смещено ближе к базальной части клетки, цитоплазма равномерно окрашивается на инсулин (*рисунок 11В*); одиночные ИСК перидуктальной области имели вытянутую форму с эксцентрично

расположенным ядром и равномерным окрашиванием на инсулин (*рисунок 11Г*); ИСК агломератов обладали морфологическими признаками ацинарных и/или протоковых эпителиоцитов (*рисунок 11Б*). Внеостровковые ИСК располагались главным образом в виде клеточных агломератов (в среднем по 2-5 клеток), в то время как одиночные ИСК были локализованы преимущественно в составе ацинусов (*таблица 4*). Особенности в локализации агломератов инсулин-продуцирующих клеток выявлено не было, поскольку в их состав входят клетки, имеющие морфологию как ацинарных клеток, так и клеток протокового эпителия.

Согласно морфометрическому исследованию, одиночные ИСК ацинарного эпителия обладали максимальными размерами цитоплазмы и интенсивности флюоресценции инсулин-позитивной области клеток по сравнению с другими ИСК (*таблица 4*).

Пролиферирующие ИСК ($Ki-67^{+}insulin^{+}$) среди внеостровковых ИСК поджелудочной железы не выявлялись (*таблица 4*). Исследование уровня апоптоза свидетельствовало, что наибольшая доля апоптотирующих клеток от общего их количества в структуре выявляется среди ИСК агломератов и одиночных ИСК протокового эпителия, тогда как среди одиночных ИСК ацинарного эпителия они не выявляются (*таблица 4*).

Резюме

В физиологических условиях ИСК поджелудочной железы располагаются в составе панкреатического островка, в виде одиночных клеток ацинарного и протокового эпителия, а также их агломератов. При этом строение и функциональная активность ИСК зависят от особенности локализации.

Основную эндокринную функцию регуляции углеводного обмена выполняют ИСК панкреатических островков [29], они составляют 98% от их общего количества. При этом β -клетки, локализованные в панкреатических островках, обладают наибольшим уровнем пролиферации и апоптоза в сравнении с внеостровковыми ИСК.

Внеостровковые ИСК обычно рассматриваются в качестве источника регенерации β -клеток панкреатических островков в условиях патологии [42, 53, 117, 132, 195]. В частности, одиночные ИСК протокового эпителия представляются в качестве клеток, находящихся в начальной стадии дифференцировки от клеток-предшественников инсулоцитов [75], поскольку существует много свидетельств повышения их числа при ожирении и во время беременности [57, 63, 165]. Также существует мнение, что агломераты ИСК представляют собой структуру незаконченного эмбрионального этапа формирования островков [144]. Это подтверждается общностью морфофункциональных характеристик ИСК агломератов и β -клеток панкреатического островка.

Кроме того, одиночные клетки, расположенные в составе ацинусов, содержат два типа секреторных гранул (зимогена и инсулина), и основная их масса контактирует с перикапиллярным пространством и только немногие имеют связь с выводными протоками [29]. Они характеризуются наибольшим содержанием инсулина и объемом цитоплазмы в сравнении с другими ИСК. Ацинарные инсулоциты способны секретировать инсулин непосредственно в межклеточное пространство и образовывать межклеточные контакты с клетками ацинусов, тем самым осуществляя паракринную регуляцию экзокринной функции поджелудочной железы [51]. Это подтверждается данными, свидетельствующими, что ацинарные клетки, локализованные вблизи с ИСК, обладают более высокой интенсивностью митозов и повышенной секреторной активностью, по сравнению с ациноцитами, расположенными в удалении от ИСК [15, 27].

Необходимо отметить также, что панкреатические островки обладают выраженной морфофункциональной неоднородностью. А именно, они отличаются интенсивностью флюоресценции инсулин-позитивной области, что создает основу для выделения среди них трех типов.

Островки с высоким содержанием инсулина характеризуются наименьшими размерами, а также высоким уровнем митотической активности

их β -клеток, по сравнению с другими панкреатическими островками. Островки с низким содержанием инсулина, на фоне наибольшего относительного количества макрофагов, обладают значительным сдвигом соотношения пролиферации и апоптоза β -клеток в сторону преобладания последнего. Островки со средним содержанием инсулина занимают промежуточное положение. При этом существует прямая взаимосвязь между содержанием инсулина в островках и пролиферативной активностью их β -клеток.

Таким образом, в физиологических условиях ИСК, а значит, и формируемые ими структуры, характеризуются гетерогенностью своей синтетической функции, а также интенсивностью процессов пролиферации и апоптоза. Это позволяет предположить, что чувствительность к действию повреждающих факторов у них также различна. Такая неоднородность повышает устойчивость инсулин-синтезирующей системы к действию повреждающих и экстремальных факторов.

Список статей, опубликованных по результатам главы 3:

1. Булавинцева, Т.С. Морфофункциональная характеристика инсулин-синтезирующих клеток различной локализации в поджелудочной железе интактных крыс / Т.С. Булавинцева, Б.Г. Юшков, И.Г. Данилова // Цитология. – 2022. – Т. 64, № 1. – С. 70-76. doi: 10.31857/S0041377122010035. (переводная версия – **Bulavintseva, T.S.** Morphofunctional characteristic of insulin-producing cells of different localization in the pancreas of intact rats / T.S. Bulavintseva, B.G. Yushkov, I.G. Danilova // Cell and Tissue Biology. – 2022. – Vol. 16, № 3. – P. 245–250. (Q4, IF Scopus – 0,8; PubMed; ВАК; ИФ РИНЦ – 0,481).

ГЛАВА 4 – ПОВРЕЖДЕНИЕ ИНСУЛИН-СИНТЕЗИРУЮЩЕЙ СИСТЕМЫ

С целью исследования чувствительности структур, синтезирующих инсулин, к повреждению, животным трехкратно внутрибрюшинно с однодневным интервалом вводили аллоксан в общей дозировке 30 мг/100г массы тела. Для подтверждения дегенеративных изменений в поджелудочной железе и развития инсулинозависимого состояния на 3-и и 7-е сутки после введения аллоксана в периферической крови экспериментальных животных оценивали уровень глюкозы и гликозилированного гемоглобина, гематологические показатели, а также морфологическую структуру органа и количество панкреатических островков. Далее на 30-е и 60-е сутки осуществляли анализ чувствительности инсулин-синтезирующих структур к повреждению, развитие компенсаторно-приспособительных реакций и влияние деструкции ИСК на их микроокружение (в частности, макрофаги).

4.1 – Ранние сроки повреждения инсулин-синтезирующей системы (3-и и 7-е сутки)

На 3-и сутки после последнего введения аллоксана экспериментальные и интактные животные не отличались по внешнему виду и массе тела, но у экспериментальных животных отмечалось увеличение потребления воды и диуреза (более быстрое в сравнении с интактными животными намочание подстилки). Помимо этого, в периферической крови экспериментальных крыс наблюдалось повышение концентрации глюкозы (*рисунок 13*), увеличение абсолютного и относительного количества моноцитов, концентрации гемоглобина и гематокрита (*таблица 6*).

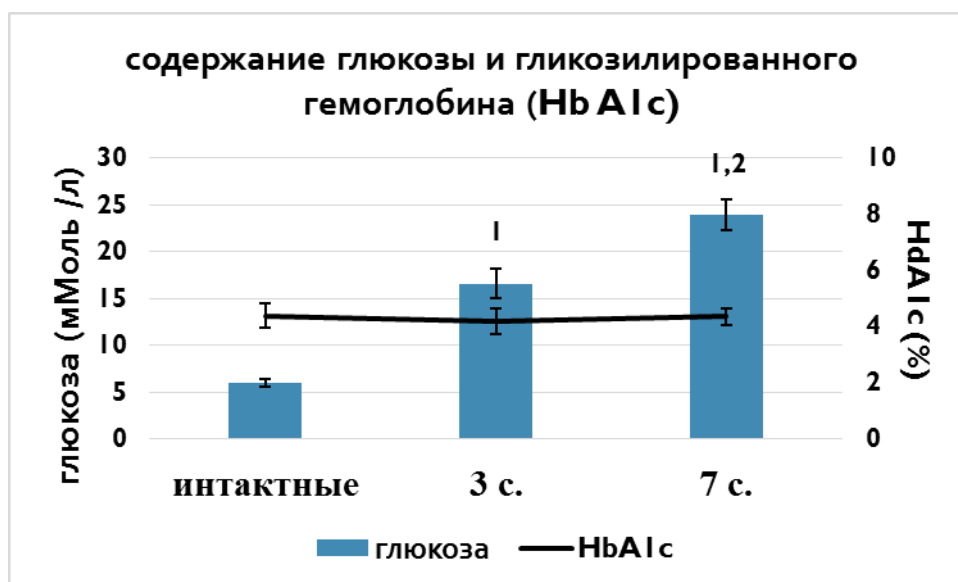


Рисунок 13 – Содержание глюкозы и гликозилированного гемоглобина в периферической крови экспериментальных животных

Примечание: Статистически значимые отличия ($P \leq 0,05$): 1 – от группы интактных животных, 2 – от группы на 3-и сутки после введения аллоксана.

Таблица 6 – Гематологические показатели периферической крови экспериментальных животных

Показатель	Интактные животные	Аллоксан 3-и сутки	Аллоксан 7-е сутки
Общее количество лейкоцитов (Т/мл)	$8,5 \pm 0,4$	$10,0 \pm 0,7$	$14,6 \pm 0,3$ ^{1,2}
Лимфоциты (Т/мл)	$5,7 \pm 0,4$	$5,7 \pm 0,5$	$9,2 \pm 0,4$ ^{1,2}
Доля лимфоцитов (%)	$66,6 \pm 2,8$	$58,0 \pm 5,3$	$62,7 \pm 2,5$
Моноциты (Т/мл)	$0,9 \pm 0,07$	$1,5 \pm 0,1$ ¹	$2,0 \pm 0,1$ ^{1,2}
Доля моноцитов (%)	$10,3 \pm 0,7$	$14,8 \pm 0,2$ ¹	$13,3 \pm 0,5$ ¹
Гранулоциты (Т/мл)	$2,0 \pm 1,2$	$2,4 \pm 0,3$	$3,7 \pm 0,3$ ^{1,2}
Доля гранулоцитов (%)	$23,6 \pm 2,0$	$27,2 \pm 5,3$	$24,0 \pm 2,0$
Общее количество эритроцитов (М/мл)	$9,3 \pm 0,3$	$10,1 \pm 0,4$	$8,7 \pm 0,1$
Гемоглобин (г/дл)	$15,5 \pm 0,3$	$18,6 \pm 0,8$ ¹	$15,5 \pm 0,1$
Гематокрит (%)	$45,1 \pm 0,9$	$52,8 \pm 2,2$ ¹	$46,7 \pm 0,1$
Общее количество тромбоцитов (Т/мл)	671 ± 34	620 ± 73	631 ± 28

Примечание: Статистически значимые отличия ($P \leq 0,05$): 1 – от группы интактных животных, 2 – от группы на 3-и сутки после введения аллоксана, 3 – от группы на 7-е сутки после введения аллоксана, 4 – от группы на 30-е сутки после введения аллоксана.

Высокое содержание глюкозы свидетельствовало о нарушении эндокринной функции инсулин-синтезирующей системы поджелудочной железы уже на 3 сутки эксперимента. При этом значительное повышение гематокрита на данном сроке отражало развитие обезвоживания вследствие повышенного диуреза, направленного на выведение избыточной глюкозы.

Нарушение функции инсулин-синтезирующей системы подтверждалось гистологическими исследованиями препаратов поджелудочной железы. В панкреатических островках выявлялись клетки с признаками плазмолизиса и пикноза ядер (*рисунок 14*), на фоне сохранения общего количества островков, их размера и общей плотности клеток (*таблица 7*). В экзокринной части поджелудочной железы определялось полнокровие трабекулярных сосудов (внутриорганных артерий и вен) и диффузное полнокровие микроциркуляторного русла с образованием сладж-комплексов (*рисунок 14*).

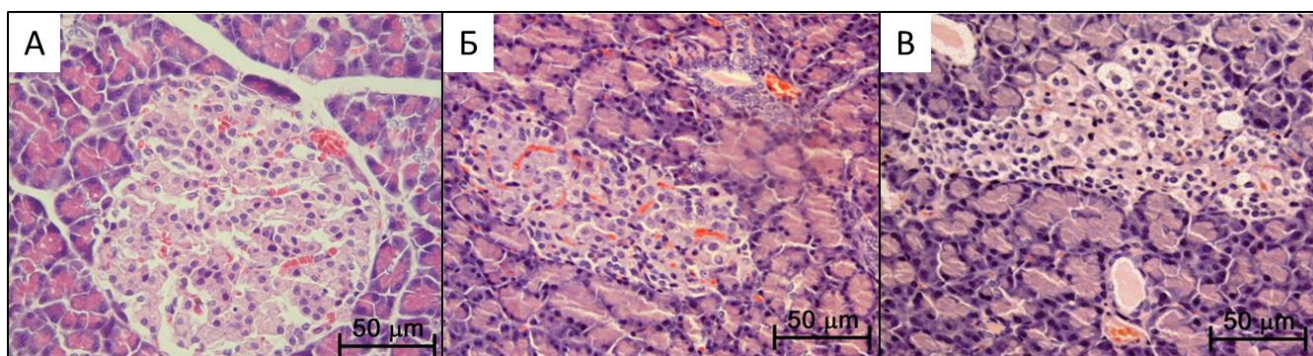


Рисунок 14 – Микрофотографии поджелудочной железы экспериментальных животных на 3-и и 7-е сутки после введения аллоксана

Примечание: Окраска гематоксилин-эозином, увеличение 40X; **А** – панкреатический островок интактного животного, **Б** – панкреатический островок крысы на 3-и сутки после введения аллоксана, **В** – панкреатический островок крысы на 7-е сутки после введения аллоксана.

На 7-е сутки в периферической крови сохранялась повышенная концентрация глюкозы (*рисунок 14*), значительно увеличивалось содержание лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов (*таблица 6*).

В поджелудочной железе нарастало количество дистрофически измененных панкреатоцитов (*рисунок 14*). Увеличивались размеры

панкреатических островков (таблица 7) за счет набухания цитоплазмы островковых клеток в результате их дистрофических изменений (рисунок 14).

Таблица 7 – Морфометрические показатели островкового аппарата поджелудочной железы экспериментальных животных

Показатель	Интактная группа	Аллоксан 3-и сутки	Аллоксан 7-е сутки
Общее количество ПО (N / 1мм ²)	2,0 ± 0,1	1,5 ± 0,3	1,8 ± 0,3
Диаметр ПО (мкм)	80 ± 6	97 ± 2	108 ± 4 ¹
Общая клеточность ПО (N/ 1 мм ²)	9 872 ± 445	8 167 ± 299	8 889 ± 536

Примечания: ПО – панкреатический островок; 1 – статистически значимые отличия от интактной группы животных (P≤0,05).

4.2 – Поздние сроки повреждения инсулин-синтезирующей системы (30-е, 60-е сутки)

Данные, полученные на 30-е и 60-е сутки после введения аллоксана, фиксируют существенные изменения в организме экспериментальных животных, вызванные поражением инсулин-продуцирующей системы.

4.2.1 – Общая характеристика животных

На данных сроках наблюдения общая масса крыс значительно снижена относительно интактной группы (рисунок 15).

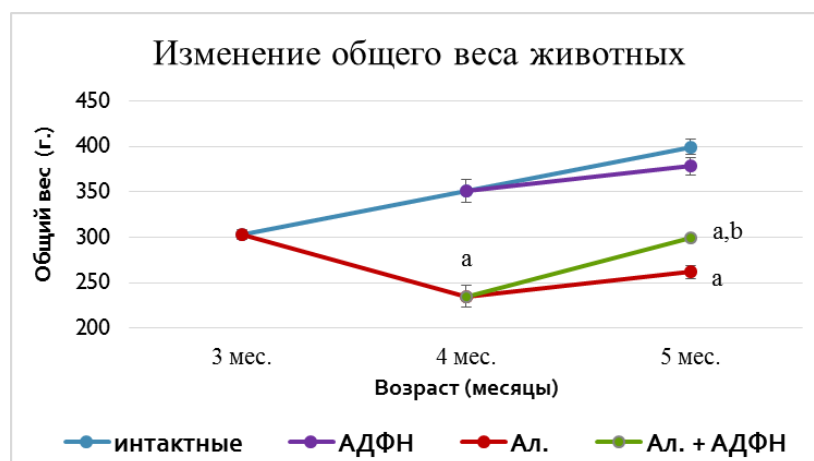


Рисунок 15 – Изменение общего веса экспериментальных животных в динамике исследования

Примечание: АДФН – группа здоровых крыс с введением препарата аминодигидрофталазидиона натрия, Ал. – группа крыс после введения аллоксана, Ал.+АДФН – группа крыс с введением аминодигидрофталазидиона натрия на 30-е сутки после аллоксана. Статистически значимые отличия (P≤0,05): 1 – от группы интактных животных, 2 – от группы на 30-е сутки после введения аллоксана.

В периферической крови крыс экспериментальной группы прогрессивно снижалась концентрация инсулина, повышался уровень глюкозы, кортикостерона и доля гликозилированного гемоглобина (*таблица 8*).

Таблица 8 – Показатели углеводного обмена экспериментальных животных

Показатель	Интактные	АДФН	Аллоксан 30 суток	Аллоксан 60 суток	Аллоксан + АДФН
Глюкоза (ммоль/л)	6,0 ± 0,4	6,2 ± 0,3	24,4 ± 1,3 ¹	30,5 ± 1,1 _{1,3}	11,2 ± 1,0 _{1,3,4}
НbA1c (%)	4,4 ± 0,2	3,9 ± 0,3	8,1 ± 0,5 ¹	7,8 ± 0,3 ¹	4,4 ± 0,4 ^{3,4}
Инсулин (мкг/л)	1,2 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0,8 ± 0,1 ¹	0,4 ± 0,05 _{1,3}	0,9 ± 0,1 ^{1,4}
Кортикостерон (нг/мл)	62,9 ± 3,8	70,1 ± 2,9	97,6 ± 6,4 ¹	99,7 ± 7,6 ¹	84,5 ± 6,0 ¹

Примечание: АДФН – аминоксидогидрофталазидиона натрия. Статистически значимые отличия ($P \leq 0,05$): 1 – от группы интактных животных, 2 – от группы здоровых животных с введением АДФН, 3 – от группы на 30-е сутки после введения аллоксана, 4 – от группы на 60-е сутки после введения аллоксана.

Кроме того, в периферической крови экспериментальных животных на 30-е сутки наблюдения сформировался выраженный лейкоцитоз за счет повышения содержания моноцитов и лимфоцитов (*таблица 9*).

На 60-е сутки количество лейкоцитов продолжало увеличиваться, повышалась концентрация моноцитов и гранулоцитов. Гематокрит также возрастал к 60-м суткам наблюдения. А содержание эритроцитов уменьшалось относительно интактных животных к 30-м суткам и нормализовался на 60-е (*таблица 9*).

На фоне лейкоцитоза в периферической крови экспериментальных животных на 30-е сутки после введения аллоксана снижалась концентрация интерлейкина-10 (IL-10), а к 60-м суткам повышались уровни интерлейкина-6 и 10 (IL-6,10), фактора некроза опухоли- α (TNF α) и инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1) (*таблица 10*).

Таблица 9 – Гематологические показатели периферической крови экспериментальных животных

Показатель	Интактные животные	АДФН	Аллоксан 30 суток	Аллоксан 60 суток	Аллоксан + АДФН
Общее количество лейкоцитов (Т/мл)	8,5 ± 0,4	7,6 ± 1,6	11,0 ± 0,7 ¹	16,2 ± 1,3 _{1,3}	8,9 ± 0,7 ^{3,4}
Лимфоциты (Т/мл)	5,7 ± 0,4	4,1 ± 0,7 ¹	7,6 ± 0,4 ¹	9,4 ± 0,9 ¹	5,3 ± 0,5 ^{3,4}
Доля лимфоцитов (%)	66,6 ± 2,8	55,8 ± 2,3 ₁	68,5 ± 1,6	57,8 ± 1,3 _{1,3}	61,6 ± 4,9
Моноциты (Т/мл)	0,9 ± 0,07	0,6 ± 0,2	1,3 ± 0,1 ¹	2,7 ± 0,2 ^{1,3}	1,1 ± 0,2 ⁴
Доля моноцитов (%)	10,3 ± 0,7	7,0 ± 0,9 ¹	12,0 ± 1,1	17,3 ± 1,1 _{1,3}	12,0 ± 1,0 ⁴
Гранулоциты (Т/мл)	2,0 ± 1,2	2,5 ± 0,4	2,0 ± 0,3	4,0 ± 0,4 ^{1,3}	2,5 ± 0,4 ⁴
Доля гранулоцитов (%)	23,6 ± 2,0	37,8 ± 2,2 ₁	36,8 ± 5,4	24,9 ± 1,1	26,4 ± 4,3
Общее количество эритроцитов (М/мл)	9,3 ± 0,3	8,3 ± 0,2	8,6 ± 0,2	9,9 ± 0,1 ³	9,3 ± 0,1 ^{3,4}
Гемоглобин (г/дл)	15,5 ± 0,3	14,6 ± 0,3	14,8 ± 0,5	13,5 ± 0,8 ¹	17,2 ± 0,3 _{1,2,3,4}
Гематокрит (%)	45,1 ± 0,9	40,2 ± 0,3 ₁	41,7 ± 1,5	48,5 ± 0,2 _{1,3}	43,5 ± 5,6 ⁴
Общее количество тромбоцитов (Т/мл)	671 ± 34	811 ± 20 ¹	626 ± 36	736 ± 58	585 ± 39 ²

Примечание: АДФН – аминоксидогидрофталазидиона натрия. Статистически значимые отличия (P≤0,05): 1 – от группы интактных животных, 2 – от группы здоровых животных с введением АДФН, 3 – от группы на 30-е сутки после введения аллоксана, 4 – от группы на 60-е сутки после введения аллоксана.

Прогрессирующее снижение концентрации инсулина в крови привело, с одной стороны, к формированию хронической гипергликемии, которая, в свою очередь, способствовала гликозилированию гемоглобина. С другой стороны, глюкоза крови становилась недоступна для инсулинозависимых тканей

организма, что стимулировало компенсаторное повышение содержания кортикостерона и активацию глюконеогенеза. Последнее также способствовало нарастанию гипергликемии.

Таблица 10 – Уровень цитокинов в периферической крови экспериментальных животных

Показатель	Интактные животные	АДФН	Аллоксан 30 суток	Аллоксан 60 суток	Аллоксан + АДФН
IL-1 α (пг/мл)	334 \pm 16	140 \pm 44	348 \pm 44	294 \pm 26	298 \pm 13
IL-6 (пг/мл)	438 \pm 10	460 \pm 20	460 \pm 70	3 735 \pm 494 _{1,2}	375 \pm 19
INF γ (пг/мл)	13 \pm 1	4 \pm 1	11 \pm 1	10 \pm 0,5	7 \pm 0,5
TNF α (пг/мл)	52 \pm 0,3	52 \pm 0,4	53 \pm 1	427 \pm 66 ^{1,2}	51 \pm 0,1
IL-10 (пг/мл)	30,9 \pm 4,2	42 \pm 10	2,0 \pm 0,5 ¹	52,0 \pm 6,8 ^{1,2}	90 \pm 15 ^{2,3}
IGF-1 (пг/мл)	1 057 \pm 11	331 \pm 82	758 \pm 129 ¹	886 \pm 79 ¹	932 \pm 97 ²

Примечание: АДФН – аминоксидогидрофталазидиона натрия. Статистически значимые отличия ($P \leq 0,05$): 1 – от группы интактных животных, 2 – от группы здоровых животных с введением АДФН, 3 – от группы на 30-е сутки после введения аллоксана, 4 – от группы на 60-е сутки после введения аллоксана.

Условия хронической гипергликемии приводили к развитию хронического воспаления, о чем свидетельствовал выраженный лейкоцитоз и повышение концентрации провоспалительных цитокинов (IL-6, TNF α) в крови. В качестве компенсаторной реакции можно рассматривать повышение содержания IL-10 и IGF-1.

Нарушение биодоступности глюкозы и хроническое воспаление приводило к снижению общего веса животных относительно нормы.

4.2.2 – Морфофункциональная характеристика состояния инсулин-синтезирующей системы

Полученные данные свидетельствовали, что в течение периода наблюдения масса поджелудочной железы, ее отношение к общему весу животных и доля ее сухого вещества соответствовали значениям интактных

животных. В то же время доля эндокринной ткани от общей площади паренхимы поджелудочной железы снизилась к 60-м суткам наблюдения (*таблица 11*).

Таблица 11 – Общая морфологическая характеристика поджелудочной железы экспериментальных животных

Показатель	Интактные	АДФН	Ал. 30 суток	Ал. 60 суток	Ал. + АДФН
Вес животного (г)	399 ± 8	378 ± 17	235 ± 12 ¹	262 ± 9 ¹	299 ± 7,2 1,2,3,4
Масса поджелудочной железы (мг)	686 ± 49	836 ± 49	780 ± 52	679 ± 47	836 ± 51
Коэффициент массы поджелудочной железы (мг/100г)	172 ± 12	222 ± 13 ¹	333 ± 21 ¹	271 ± 21 ¹	318 ± 24 ^{1,2}
Сухая масса (%)	29 ± 1	31 ± 2	28 ± 1	30 ± 1	29 ± 0,5
Доля эндокринной ткани от всей поджелудочной железы (%)	1,7 ± 0,3	1,2 ± 0,2	1,8 ± 0,2	1,0 ± 0,2 1,3	1,1 ± 0,1 ³

Примечание: АДФН – аминоксидогидрофталазидиона натрия. Статистически значимые отличия ($P \leq 0,05$): 1 – от группы интактных животных, 2 – от группы здоровых животных с введением АДФН, 3 – от группы на 30-е сутки после введения аллоксана, 4 – от группы на 60-е сутки после введения аллоксана.

Морфологическое исследование поджелудочной железы на 30-е и 60-е сутки после введения аллоксана выявило повреждение всех структур органа: эндокринной, экзокринной части и сосудистого русла.

В панкреатических островках на 30-е сутки после введения аллоксана выявлялись дегенеративные изменения, а именно, стирание капсулы островка, отделяющей его от экзокринной части органа. Сами островки приобрели неправильную форму. В части островков отмечалось наличие дистрофически измененных эндокриноцитов (сморщивание и карнопикноз клеток) (*рисунок 16*).

К 60-м суткам в островках помимо дистрофических изменений определялся также очаговый некроз клеток (*рисунок 16*).

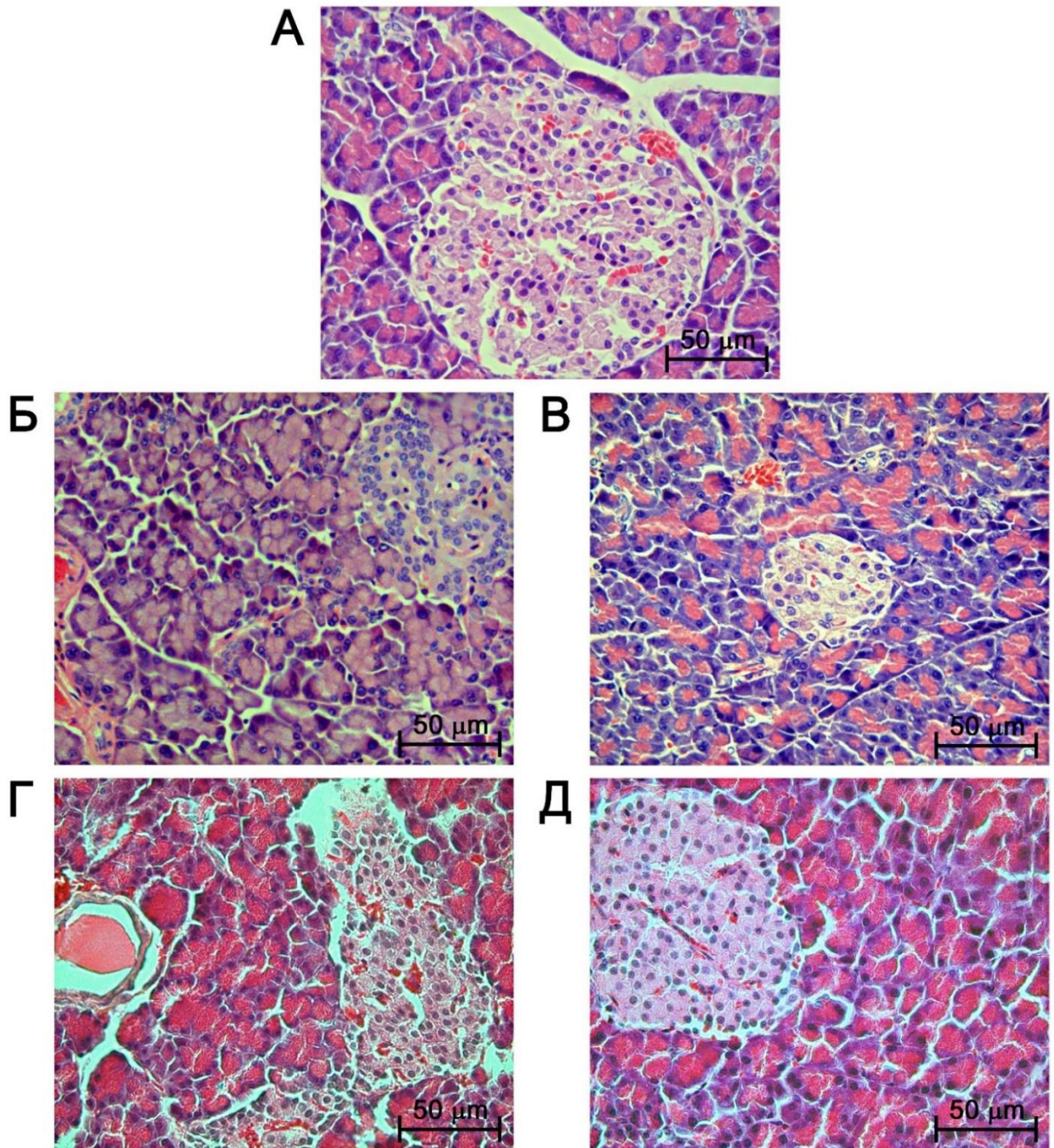


Рисунок 16 – Микрофотографии образцов поджелудочной железы экспериментальных животных на 30-е и 60-е сутки после введения аллоксана

Примечание: Окраска гематоксилин-эозином, увеличение 40X; А – панкреатический островок интактного животного, Б – панкреатический островок крысы на 30-е сутки после введения аллоксана, В – панкреатический островок здорового животного после проведения курса с введением препарата амидигидрофталазидиона натрия, Г – панкреатический островок крысы на 60-е сутки после введения аллоксана, Д – панкреатический островок животного, которому на 30-сутки после введения аллоксана провели курс инъекций (30 суток) с препаратом аминодигидрофталазидиона натрия.

В экзокринной части на 30-е сутки было выявлено расширение просвета междольковых протоков, в котором выявлялись эозинофильные массы. В

ацинарных клетках были определены очаговые дистрофические изменения: нарушение полярности клеток, кариолизис и гидропическая дистрофия эпителиоцитов (*рисунок 16*).

На 60-е сутки выявлялись признаки склеротических изменений протоков, в ацинусах присутствовала очаговая дистрофия в виде нарушения полярности клеток, а также истончение базальной и увеличение апикальной части клеток, набухание цитоплазмы (*рисунок 16*).

Изменения со стороны сосудистого русла на 30-е сутки были связаны с развитием полнокровия и капилляростаза междольковых трабекулярных сосудов с сопутствующим набуханием эндотелия. В части сосудов было обнаружено плазменное пропитывание сосудистой стенки. К 60-м суткам отмечалось развитие склеротических изменений сосудов микро- и макроциркуляции, капилляростаз в островках и экзокринной части органа (*рисунок 16*).

Суммируя вышеизложенное, нарушение углеводного обмена способствует развитию деструктивно-дегенеративных изменений, затрагивающих все отделы поджелудочной железы. Однако это не приводит к изменению общей массы и доли сухого вещества органа.

Инсулин-секретирующие структуры в поджелудочной железе животных после введения аллоксана, как и у интактных животных, были представлены всеми компонентами: панкреатическими островками и одиночными ИСК, а также их агломератами.

30-е сутки. Несмотря на то, что общее количество инсулин-синтезирующих структур в единице площади (1 мм^2) паренхимы поджелудочной железы животных на 30-е сутки эксперимента сохранялось на уровне интактных животных, менялось их соотношение. Количество панкреатических островков снижалось на 29% относительно нормы, а одиночных ИСК – возрастает в 2 раза, при этом содержание агломератов не менялось (*рисунок 17*).

Данные изменения привели к выравниванию соотношения количества панкреатических островков к внеостровковым инсулин-синтезирующим

структурам (1 : 1,2), в то время как в норме преобладали островки Лангерганса (1,5 : 1).

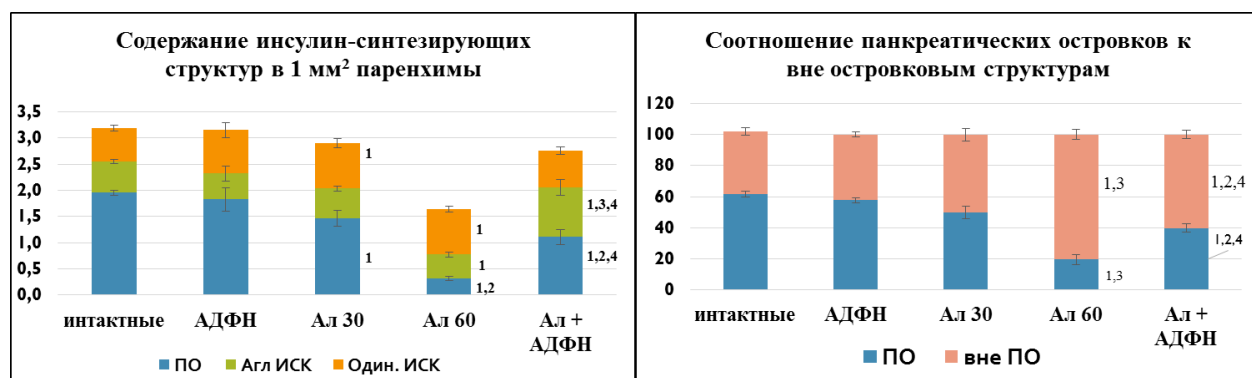


Рисунок 17 – Изменение содержания инсулин-синтезирующих структур в 1 мм² паренхимы поджелудочной железы экспериментальных животных

Примечание: ПО – панкреатический островок, Агл ИСК – агломераты инсулин-синтезирующих клеток, Один. ИСК – одиночные инсулин-синтезирующие клетки, АДФН – группа здоровых крыс с введением препарата аминодигидрофтазилона натрия, Ал. 30 – группа крыс на 30-е сутки после введения аллоксана, Ал. 60 группа крыс на 60-е сутки после введения аллоксана, Ал. + АДФН – группа крыс с введением аминодигидрофтазилона натрия на 30-е сутки после введения аллоксана. Статистически значимые отличия ($P \leq 0,05$): 1 – от группы интактных животных, 2 – от группы с АДФН; 3 – от группы на 30-е сутки после введения аллоксана; 4 – от группы на 60-е сутки после введения аллоксана.

На 60-е сутки эксперимента отмечалось уменьшение общего количества инсулин-синтезирующих структур относительно интактных животных и предыдущего срока наблюдения. Это было связано главным образом с выраженным уменьшением количества панкреатических островков и агломератов ИСК. Абсолютное количество одиночных ИСК при этом превышало значение интактных животных и соответствовало уровню предыдущего срока наблюдения. Доля островков от общего количества инсулин-синтезирующих структур снижалась, а доля одиночных ИСК увеличивалась в сравнении со значениями интактных животных и предыдущего срока наблюдения (рисунок 17). Эти количественные изменения приводили к дальнейшему смещению соотношения между островками и внеостровковыми инсулин-секретирующими структурами в сторону преобладания последних (1:4).

Изменение содержания и распределения ИСК. Наряду с изменением количества инсулин-синтезирующих структур было отмечено выраженное снижение общего количества ИСК.

На 30-е сутки наблюдения общее их количество снижалось более чем в 2 раза по сравнению с интактными животными за счет уменьшения содержания ИСК в панкреатических островках и агломератах. Количество одиночных клеток увеличивалось в протоковом эпителии, на фоне сохранения их содержания в ацинусах. При этом, как и в норме, наибольшая доля ИСК (95%) была локализована в панкреатических островках (*таблица 12*).

К 60-м суткам общее количество ИСК продолжало уменьшаться за счет ИСК островков. Содержание ИСК, локализованных в экзокринной части органа в виде агломератов и одиночных клеток, статистически значимо не отличалось от уровня 30-х суток эксперимента, хотя количество ИСК протокового эпителия снижалось. При этом большая доля ИСК была локализована в островках (*таблица 12*).

Наряду с количественными изменениями инсулин-синтезирующих структур менялись также и их морфофункциональные характеристики.

Панкреатические островки

На 30-е сутки после введения аллоксана в панкреатических островках на фоне сохранения их размеров и общей клеточности снижалась плотность β -клеток и содержание в них инсулина (*таблица 13*).

Исследование пролиферативной активности эндокриноцитов продемонстрировало сохранение количества пролиферирующих β -клеток. Однако доля пролиферирующих β -клеток от всех инсулиноцитов островка возрасла на фоне снижения их общего количества (*таблица 13*). Интенсивность апоптоза β -клеток при этом значительно увеличивалась, а соотношение этих процессов смещалось в сторону апоптоза (*таблица 13*).

На 60-е сутки размеры и общая клеточность панкреатических островков соответствовало уровню интактных животных. Количество β -клеток снижалось в 2 раза относительно предыдущего срока эксперимента и составляет 20% от

значений интактных животных. При этом средняя их синтетическая активность сохранялась на уровне 30-х суток эксперимента (таблица 13).

Таблица 12 – Распределение инсулин-синтезирующих клеток в 1 мм² паренхимы поджелудочной железы экспериментальных животных

Показатель	Интактные животные	АДФН	Аллоксан 30 суток	Аллоксан 60 суток	Аллоксан + АДФН
Общее количество ИСК	109,3 ± 10,4	92,3 ± 5,2	44,4 ± 6,2 ¹	16,5 ± 2,3 ^{1,3}	35,4 ± 4,8 _{1,2,4}
(%)	100	100	100	100	100
Количество островковых ИСК	107,1 ± 10,5	90,1 ± 5,2	43,0 ± 6,2 ¹	14,3 ± 2,6 ^{1,2,3}	32,0 ± 4,7 _{1,2,4}
(%)	97,8 ± 0,3	97,6 ± 0,5	96,0 ± 0,8 ¹	85,2 ± 3,8 ^{1,2,3}	89,8 ± 1,2 _{1,2,3,4}
Количество ИСК образующих агломерат	1,6 ± 0,2	1,4 ± 0,5	0,6 ± 0,1 ¹	1,3 ± 0,4	2,7 ± 0,3 _{1,2,3,4}
(%)	1,6 ± 0,2	1,5 ± 0,5	1,7 ± 0,1	9,0 ± 3,0 ^{1,3}	8,1 ± 1,1 _{1,2,3,4}
Количество одиночных ИСК	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,1 ¹	0,9 ± 0,1 ¹	0,7 ± 0,1
(%)	0,6 ± 0,1	0,9 ± 0,2	2,3 ± 0,5 ¹	5,8 ± 1,0 ^{1,3}	2,1 ± 0,2 ^{1,2,4}

Примечание: АДФН – аминоксидогидрофталазидиона натрия. Статистически значимые отличия ($P \leq 0,05$): 1 – от группы интактных животных, 2 – от группы здоровых животных с введением АДФН, 3 – от группы на 30-е сутки после введения аллоксана, 4 – от группы на 60-е сутки после введения аллоксана.

Исследование интенсивности пролиферации в островках на данном сроке исследования выявило ее снижение в 2,5 раза относительно 30-х суток, при этом уровень апоптоза не изменялся. В связи с этим, апоптоз β -клеток также превышал их пролиферацию (таблица 13).

Таблица 13 – Морфофункциональная характеристика панкреатических островков экспериментальных животных

Показатель	Интактные	АДФН	Ал. 30 суток	Ал. 60 суток	АЛ. + АДФН
Характеристика островка					
Диаметр ПО (мкм)	80 ± 6	102 ± 6	88 ± 7	79 ± 3	75,0 ± 0,6 ²
Общая клеточность ПО / мм ² ПО	9 872 ± 445	10 839 ± 550	9 317 ± 673	9 709 ± 366	9 131 ± 478
Количество β-клеток / мм ² ПО	6 750 ± 198	7 362 ± 416	2 746 ± 362 ¹	1 380 ± 261 ^{1,3}	4 007 ± 401 ^{1,2,3,4}
Доля β-клеток от общего кол-ва клеток (%)	67 ± 2	68 ± 1	34 ± 6 ¹	16 ± 2 ^{1,3}	41 ± 3 ^{1,2,4}
Характеристика β-клеток					
Интенсивность флуоресценции инсулина β-клетки (усл. ед.)	33,7 ± 1,7	32,8 ± 2,1	18,3 ± 2,7 ¹	18,7 ± 3,4 ¹	48,2 ± 5,3 ^{1,2,3,4}
Площадь ядра ИСК (мкм ²)	24,5 ± 0,6	22,1 ± 0,6 ¹	26,4 ± 1,3	24,9 ± 0,7	27,2 ± 0,7 ^{1,2}
Площадь цитоплазмы ИСК (мкм ²)	48,6 ± 3,4	53,4 ± 1,7 ¹	52,1 ± 2,1	66,1 ± 5,2 ^{1,3}	62,1 ± 3,5 ^{1,2,3,4}
ЯЦО ИСК	0,52 ± 0,03	0,41 ± 0,02 ¹	0,52 ± 0,04	0,40 ± 0,03 ^{1,3}	0,45 ± 0,03 ²
Пролиферативная активность (Ki-67 ⁺)					
Количество Ki-67 ⁺ β-клеток / мм ² ПО	40,6 ± 1,5	40,1 ± 4,1	45,0 ± 7,3	19,3 ± 3,5 ^{1,3}	55,8 ± 11,2 ⁴
Доля Ki-67 ⁺ β-клеток от всех β-клеток (%)	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1	8,6 ± 3,6 ¹	2,3 ± 0,5 ¹	3,4 ± 0,9 ^{1,2,3}
Апоптоз (TUNEL ⁺)					
Количество TUNEL ⁺ β-клеток / мм ² ПО	42 ± 8	76 ± 5 ¹	524 ± 91 ¹	338 ± 49 ¹	209 ± 32 ^{1,2,3}
Доля TUNEL ⁺ β-клеток от всех β-клеток (%)	0,6 ± 0,1	1,0 ± 0,1 ¹	22,0 ± 2,5 ¹	27,9 ± 3,3 ^{1,2}	4,0 ± 0,4 ^{1,2,3,4}
Ki-67 ⁺ β-клеток / TUNEL ⁺ β-клеток	1,20 ± 0,3	0,57 ± 0,05 ¹	0,11 ± 0,02 ¹	0,07 ± 0,02 ^{1,2}	0,31 ± 0,03 ^{1,3,4}

Примечание: АДФН – аминоксигидрофталазида натрия. Статистически значимые отличия (P≤0,05): 1 – от группы интактных животных, 2 – от группы здоровых животных с введением АДФН, 3 - от группы на 30-е сутки после введения аллоксана, 4 – от группы на 60-е сутки после введения аллоксана.

Анализ количественного распределения панкреатических островков с различной синтетической активностью на 30-е сутки после воздействия свидетельствовал, что помимо уменьшения общего количества островков изменилось и соотношение островков с различной синтетической активностью их β -клеток. На фоне значительного уменьшения количества островков I и II типа, доля островков III типа увеличилась (рисунк 18).

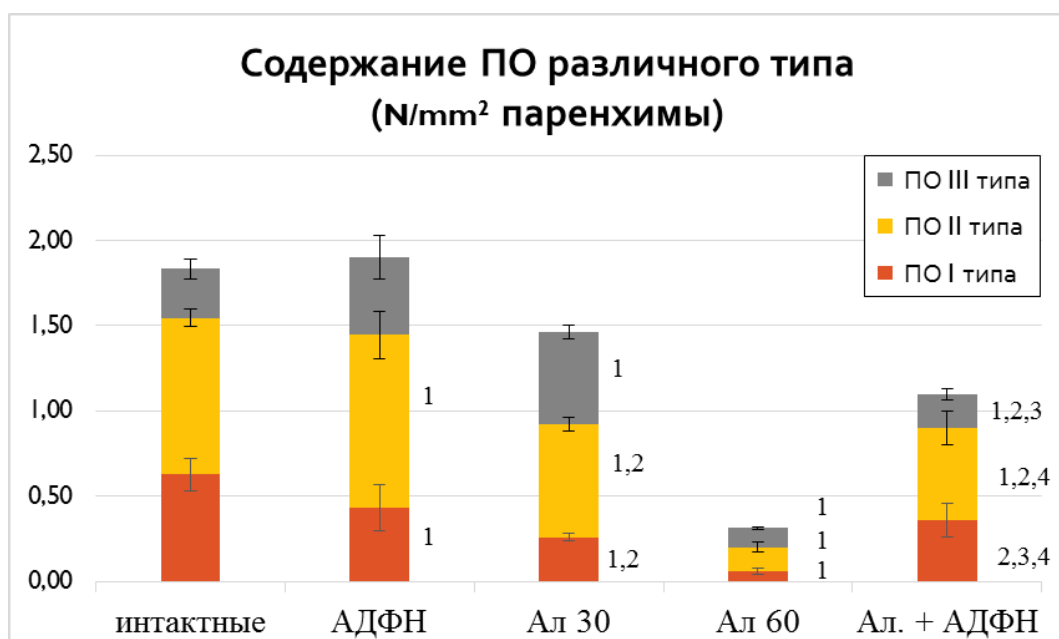


Рисунок 18 – Распределение островков с различной синтетической активностью у экспериментальных животных

Примечание: ПО – панкреатический островок, АДФН – группа здоровых крыс с введением аминоксидогидрофалазида натрия, Ал 30 – группа крыс на 30-е сутки после введения аллоксана, Ал 60 – группа крыс на 60-е сутки после введения аллоксана, Ал. + АДФН – группа крыс с введением аминоксидогидрофалазида натрия на 30-е сутки после введения аллоксана. Статистически значимые отличия ($P \leq 0,05$): 1 – от группы интактных животных, 2 – от группы с АДФН; 3 – от группы на 30-е сутки после введения аллоксана; 4 – от группы на 60-е сутки после введения аллоксана.

Помимо изменения соотношения островков различных типов отмечалось также изменение их морфофункциональных параметров.

В островках I типа (с высокой синтетической активностью) наблюдалось двукратное снижение количества β -клеток (таблица 14). Однако, сохранившиеся β -клетки островков обладали признаками гипертрофии, у них равномерно

увеличивались размеры ядра и цитоплазмы (таблица 14). При этом на фоне высокой синтетической активности ИСК отмечалось отсутствие пролиферации β -клеток, а уровень апоптоза увеличивался почти в 9 раз относительно интактных животных (таблица 14).

Таблица 14 – Характеристика панкреатических островков I типа (с высоким содержанием инсулина в их β -клетках) экспериментальных животных

Показатель	Интактные животные	АДФН	Аллоксан 30 суток	Аллоксан 60 суток	Аллоксан + АДФН
Доля от общего количества (%)	37 ± 3	19 ± 4 ¹	18 ± 1 ¹	14 ± 3 ¹	39 ± 7 ^{3,4}
Характеристика островка					
Диаметр ПО (мкм)	54 ± 4	72 ± 7	64 ± 3	57 ± 6	47 ± 5
Общая клеточность ПО / мм ² ПО	10 978 ± 431	10 190 ± 436	10 194 ± 584	10 065 ± 528	10 371 ± 264
Кол-во β -клеток / мм ² ПО	6 800 ± 229	7 647 ± 609	3 524 ± 223 ¹	3 204 ± 461 ¹	5 472 ± 401 ^{2,3,4}
Доля β -клеток (%)	60 ± 3	73 ± 4 ¹	33 ± 4 ¹	24 ± 4 ¹	53 ± 4 ^{2,3,4}
Характеристика β -клеток островка					
S ядра (мкм ²)	22,6 ± 1,2	20,3 ± 1,7	29,3 ± 1,0 ¹	23,9 ± 1 ³	27,3 ± 1,2 ^{1,4}
S цитоплазмы (мкм ²)	44,3 ± 4,3	50,7 ± 3,4	57,4 ± 1,1 ¹	47,1 ± 2,0 ³	59,8 ± 1,3 ^{1,4}
ЯЦО β -клеток	0,53 ± 0,03	0,40 ± 0,02 ₁	0,52 ± 0,02	0,5 ± 0,02	0,46 ± 0,02
Пролиферация (Ki-67 ⁺)					
Кол-во Ki-67 ⁺ β -клеток / мм ² ПО	65 ± 5	44 ± 4 ¹	0 ¹	0 ¹	51 ± 5 ^{3,4}
Доля Ki-67 ⁺ β -клеток от всех β -клеток (%)	0,8 ± 0,1	0,6 ± 0,1 ¹	0 ¹	0 ¹	2,1 ± 0,9 ^{1,2,3,4}
Апоптоз (TUNEL ⁺)					
Кол-во TUNEL ⁺ β -клеток / мм ² ПО	73 ± 4	119 ± 30 ¹	563 ± 64 ¹	2 207 ± 359 _{1,3}	362 ± 55 _{1,2,4}

Продолжение таблицы 14

Доля TUNEL ⁺ β-клеток от всех β-клеток (%)	1,1 ± 0,1	1,7 ± 0,3	13,2 ± 0,8 ^{1,2}	48,8 ± 5,1 ^{1,3}	6,0 ± 1,2 ^{1,2,3,4}
Ki-67 ⁺ β-клеток / TUNEL ⁺ β- клеток	0,93 ± 0,08	0,51 ± 0,09 ₁	0 ¹	0 ¹	0,20 ± 0,03 ^{1,2,3,4}

Примечание: ПО – панкреатический островок, АДФН – аминоксидогидрофталазидиона натрия. Статистически значимые отличия ($P \leq 0,05$): 1 – от группы интактных животных, 2 – от группы здоровых животных с введением АДФН, 3 – от группы на 30-е сутки после введения аллоксана, 4 – от группы на 60-е сутки после введения аллоксана.

В островках II типа (со средним содержанием инсулина) размеры ядра и цитоплазмы, а также пролиферативная активность β-клеток соответствовали норме, а уровень их апоптоза возрастал в 7 раз относительно интактных животных (таблица 15).

Таблица 15 – Характеристика панкреатических островков II типа (со средним содержанием инсулина в их β-клетках) экспериментальных животных

Показатель	Интактные животные	АДФН	Аллоксан 30 суток	Аллоксан 60 суток	Аллоксан + АДФН
Доля от общего количества (%)	50 ± 3	61 ± 4 ¹	45 ± 2	49 ± 5	46 ± 6 ²
Характеристика островка					
Диаметр ПО (мкм)	73 ± 6	94 ± 7	68 ± 2	83 ± 4	64 ± 5
Общая клеточность ПО / мм ² ПО	11 064 ± 407	10 773 ± 408	9 262 ± 242	10 185 ± 434	10 502 ± 267
Количество β-клеток / мм ² ПО	6 732 ± 232	7 928 ± 358 ¹	3 165 ± 139 ₁	1 765 ± 336 _{1,3}	5 233 ± 279 _{1,2,3,4}
Доля β-клеток (%)	59 ± 2	72 ± 1 ¹	34 ± 2 ¹	16 ± 4 ^{1,3}	50 ± 2 ^{1,2,3,4}
Характеристика β-клеток островка					
S ядра β-клеток (мкм ²)	24,9 ± 0,6	22,2 ± 1,1 ¹	27,7 ± 0,8	27,2 ± 0,9	27,7 ± 0,7 ^{1,2}
S цитоплазмы β-клеток (мкм ²)	43,7 ± 3,7	51,5 ± 2,9	46,7 ± 1,7	59,1 ± 3,0 _{1,3}	57,4 ± 3,4 ¹
ЯЦО β-клеток	0,60 ± 0,04	0,44 ± 0,03 ¹	0,63 ± 0,02	0,46 ± 0,01 _{1,3}	0,49 ± 0,03
Пролиферация (Ki-67 ⁺)					
Количество Ki-67 ⁺ β-клеток / мм ² ПО	37 ± 3	62 ± 6 ¹	45 ± 6	18 ± 2 ^{1,3}	47 ± 8 ⁴

Продолжение таблицы 15

Доля Ki-67 ⁺ β-клеток от всех β-клеток (%)	0,5 ± 0,03	0,8 ± 0,1 ¹	1,6 ± 0,2	1,8 ± 0,5 ¹	2,4 ± 0,5 ^{1,2}
Апоптоз (TUNEL ⁺)					
Количество TUNEL ⁺ β-клеток / мм ² ПО	42 ± 5	69 ± 6 ¹	536 ± 51 ¹	415 ± 52 ¹	214 ± 17 ^{1,3,4}
Доля TUNEL ⁺ β-клеток от всех β-клеток (%)	0,6 ± 0,1	0,9 ± 0,1	38,6 ± 1,7 ¹	25,2 ± 4,2 _{1,3}	3,8 ± 0,3 _{1,2,3,4}
Ki-67 ⁺ β-клеток / TUNEL ⁺ β-клеток	1,09 ± 0,21	1,01 ± 0,08	0,11 ± 0,01 ₁	0,04 ± 0,002 ¹	0,26 ± 0,04 _{1,2,3,4}

Примечание: ПО – панкреатический островок, АДФН – аминодигидрофталазидиона натрия. Статистически значимые отличия (P≤0,05): 1 – от группы интактных животных, 2 – от группы здоровых животных с введением АДФН, 3 – от группы на 30-е сутки после введения аллоксана, 4 – от группы на 60-е сутки после введения аллоксана.

В островках III типа (с низкой синтетической активностью) было выявлено увеличение размеров цитоплазмы β-клеток относительно интактных животных на фоне сохранения размеров ядра (*таблица 16*). В отличие от островков с высокой и средней интенсивностью флюоресценции, в островках с низкой синтетической активностью отмечалось трехкратное повышение пролиферативной активности. Однако интенсивность апоптоза β-клеток возрастала в 6 раз, что привело к значительному снижению соотношения этих процессов в сравнении с нормой (*таблица 16*).

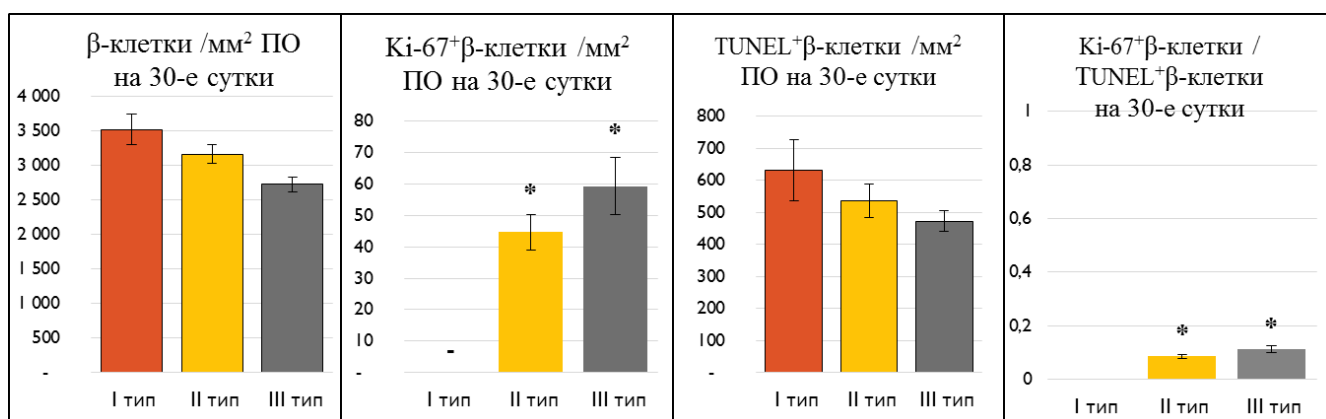


Рисунок 19 – Сравнительная характеристика панкреатических островков с различной синтетической активностью у экспериментальных животных на 30-е сутки после введения аллоксана

Примечание: ПО – панкреатический островок. * – статистически значимые отличия от значений панкреатических островков I типа (P≤0,05).

На 60-е сутки отмечалось равномерное снижение количества островков всех типов, что привело к сохранению их соотношения на уровне 30-х суток наблюдения (*рисунок 17*).

В островках I типа (с высокой синтетической активностью) было отмечено сохранение плотности β -клеток на 30-е сутки наблюдения. Размер цитоплазмы и ядра β -клеток снизился относительно предыдущего срока наблюдения до значений интактных животных (*таблица 14*). Пролиферирующие β -клетки в данном типе островков не выявлялись, также, как и на предыдущем сроке исследования. Однако отмечалось увеличение количества апоптотических β -клеток в три раза относительно 30-х суток (*таблица 14*).

В островках II типа (со средней секреторной активностью) выявлялось уменьшение количества β -клеток в 2 раза относительно 30-х суток. При этом у сохранившихся было отмечено увеличение размеров цитоплазмы на 27% относительно значений на 30-е сутки исследования на фоне сохранения размеров ядра, что привело к уменьшению ядерно-цитоплазматического отношения клеток (*таблица 15*). Исследование пролиферативной активности β -клеток продемонстрировало значительное уменьшение ее интенсивности относительно 30-х суток и интактных животных. В то же время уровень апоптоза соответствовал 30-м суткам, в результате чего соотношение этих процессов значительно сдвинулось в сторону преобладания последнего (*таблица 15*).

В островках III типа (с низкой синтетической активностью) наблюдалось двукратное снижение количества β -клеток относительно 30-х суток после введения аллоксана. Вместе с этим объем цитоплазмы инсулиноцитов соответствовал параметрам предыдущего срока эксперимента и превышал уровень интактных животных на 18% (*таблица 16*). Пролиферативная активность β -клеток снизилась до уровня интактных животных, а уровень их апоптоза остался без изменений. Таким образом, их соотношение значительно сместилось в сторону преобладания деструкции (*таблица 16*).

Таблица 16 – Характеристика панкреатических островков III типа (с низким содержанием инсулина в их β -клетках) экспериментальных животных

Показатель	Интактные животные	АДФН	Аллоксан 30 суток	Аллоксан 60 суток	Аллоксан + АДФН
Доля от общего количества (%)	14 ± 2	19 ± 3	37 ± 2 ¹	37 ± 5 ¹	15 ± 3 ^{3,4}
Характеристика островка					
Диаметр ПО (мкм)	74 ± 6	81 ± 3	78 ± 2	78 ± 7	62 ± 6
Общая клеточность ПО / мм ² ПО	10 912 ± 828	11 370 ± 810	10 471 ± 293	10 486 ± 288	10 713 ± 207
Количество β -клеток / мм ² ПО	7 511 ± 438	7 544 ± 536	2 728 ± 109 ¹	1 758 ± 237 ^{1,3}	4 416 ± 438 ^{1,2,3,4}
Доля β -клеток (%)	66 ± 2	65 ± 5	26 ± 2 ¹	12 ± 1 ^{1,3}	41 ± 4 ^{1,2,3,4}
Характеристика β -клеток островка					
S ядра β -клеток (мкм ²)	24,4 ± 0,9	20,2 ± 1,1 ¹	28,9 ± 0,7	24,0 ± 1,0	27,1 ± 1,0 ²
S цитоплазмы β -клеток (мкм ²)	41,7 ± 2,3	52,0 ± 4,2	52,7 ± 0,9 ¹	53,4 ± 2,2 ¹	60,1 ± 4,0 ¹
ЯЦО β -клеток	0,58 ± 0,04	0,40 ± 0,02 ₁	0,52 ± 0,01 ¹	0,51 ± 0,01 ¹	0,45 ± 0,04 ¹
Пролиферация (Ki-67 ⁺)					
Количество Ki-67 ⁺ β -клеток / мм ² ПО	21 ± 3	18 ± 1	51 ± 5 ¹	28 ± 3 ³	162 ± 35 ^{1,2,4}
Доля Ki-67 ⁺ β -клеток от всех β -клеток (%)	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,01	4,0 ± 0,8 ¹	3,0 ± 0,6 ¹	3,1 ± 0,3 ^{1,2}
Апоптоз (TUNEL ⁺)					
Количество TUNEL ⁺ β -клеток / мм ² ПО	71 ± 7	81 ± 11	473 ± 33 ¹	351 ± 50 ¹	173 ± 39 ^{1,3,4}
Доля TUNEL ⁺ β -клеток от всех β -клеток (%)	0,9 ± 0,1	1,1 ± 0,2	20,2 ± 2,4 ¹	16,0 ± 0,8 ¹	4,1 ± 0,4 _{1,2,3,4}
TUNEL ⁺ β -клеток / Ki-67 ⁺ β -клеток	0,32 ± 0,06	0,24 ± 0,04	0,11 ± 0,01 ¹	0,08 ± 0,001 _{1,3}	0,92 ± 0,12 _{1,2,3,4}

Примечание: АДФН – аминоксидогидрофталазидиона натрия. Статистически значимые отличия (P ≤ 0,05): 1 – от группы интактных животных, 2 – от группы здоровых животных с введением АДФН, 3 – от группы на 30-е сутки после введения аллоксана, 4 – от группы на 60-е сутки после введения аллоксана.

Сравнительный анализ морфофункциональных параметров островков различных типов на 60-е сутки исследования свидетельствовал, что плотность β -клеток и уровень их апоптоза в островках I типа значительно преобладает над этими показателями в островках II и III типа. В то же время островки III типа характеризовались наибольшим количеством пролиферирующих β -клеток (рисунок 20).

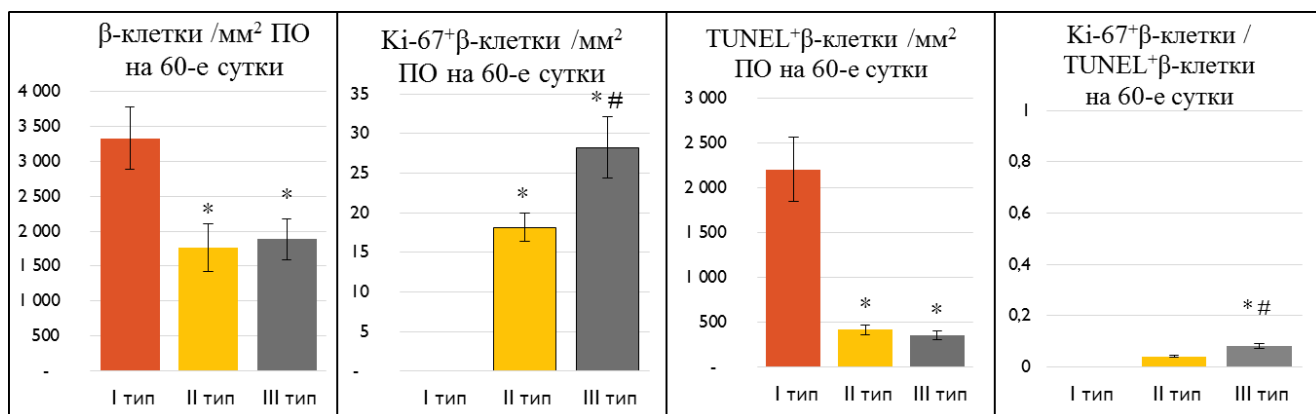


Рисунок 20 – Сравнительная характеристика панкреатических островков с различной синтетической активностью у экспериментальных животных на 60-е сутки после введения аллоксана

Примечание: ПО – панкреатический островок; * – статистически значимые отличия от значений островков I типа; # – статистически значимые отличия от значений островков II типа ($P \leq 0,05$).

В ходе корреляционного анализа, в отличие от предыдущего срока наблюдения, была выявлена прямая зависимость интенсивности флюоресценции инсулин-позитивной области островка с плотностью ИСК (коэффициент корреляции Спирмена $R=0,70$ при $P=0,01$) и уровнем их апоптоза (коэффициент корреляции Спирмена $R=0,82$ при $P=0,001$). При этом зависимость между интенсивностью флюоресценции инсулина и количеством пролиферирующих β -клеток в островках носила обратный характер (R Спирмена = $-0,92$ при $P=0,001$). Эти данные свидетельствуют, что вступление ИСК в апоптоз панкреатических островков связано с функциональным перенапряжением, а пролиферативно активные β -клетки преимущественно локализованы в островках с низкой синтетической активностью и сниженной плотностью инсулиноцитов.

Агломераты инсулин-синтезирующих клеток (ИСК)

В ходе морфофункционального исследования агломератов ИСК поджелудочной железы на 30-е сутки после введения аллоксана было выявлено снижение плотности их ИСК. При этом интенсивность синтеза инсулина, а также уровень пролиферации и апоптоза этих клеток соответствовал интактным животным (таблица 17).

Таблица 17 – Морфофункциональная характеристика агломератов ИСК поджелудочной железы экспериментальных животных

Показатель	Интактные животные	АДФН	Аллоксан 30 суток	Аллоксан 60 суток	Аллоксан + АДФН
Кол-во ИСК / мм ² агломерата	13 082 ± 330	12 406 ± 477	9 312 ± 558 ¹	10 049 ± 662 ₁	13 207 ± 603 _{2,3,4}
Площадь ядра ИСК (мкм ²)	25,2 ± 1,0	20,2 ± 0,6 ¹	25,0 ± 1,5	25,9 ± 1,6	26,0 ± 1,1 ²
Площадь цитоплазмы ИСК (мкм ²)	51,7 ± 3,9	37,7 ± 1,7 ¹	56,5 ± 7,7	67,4 ± 6,8	58,0 ± 4,4 ²
ЯЦО ИСК	0,50 ± 0,04	0,54 ± 0,03	0,50 ± 0,09	0,40 ± 0,04	0,45 ± 0,02 ²
Интенсивность флюоресценции insulin (усл. ед.)	38,0 ± 4,2	39,5 ± 4,9	42,9 ± 3,3	35,7 ± 4,6	51,6 ± 4,3 _{1,2,4}
Кол-во Ki-67 ⁺ ИСК / мм ² агломерата	0	2 083 ± 402 ¹	0 ²	0 ²	0 ²
Кол-во TUNEL ⁺ ИСК / мм ² агломерата	1 564 ± 150	2 013 ± 122	1 894 ± 166	1 353 ± 216 ²	2 000 ± 293
Доля TUNEL ⁺ ИСК от общего кол-ва ИСК агломерата (%)	11,7 ± 0,03	17,0 ± 3,3 ¹	19,4 ± 2,0 ¹	15,3 ± 2,2	16,9 ± 3,1

Примечание: ИСК – инсулин-секретирующие клетки, АДФН – аминоксидогидрофталазидиона натрия. Статистически значимые отличия (P≤0,05): 1 – от группы интактных животных, 2 – от группы здоровых животных с введением АДФН, 3 – от группы на 30-е сутки после введения аллоксана, 4 – от группы на 60-е сутки после введения аллоксана.

На 60-е сутки исследования плотность ИСК в агломератах, их синтетическая и пролиферативная активность, а также уровень апоптоза соответствовал 30-м суткам наблюдения (таблица 17).

Одиночные инсулин-синтезирующих клеток

На 30-е сутки после введения аллоксана количество ИСК в составе ацинарного эпителия соответствовало интактным животным, при этом наблюдалась значительная активация их апоптоза, при отсутствии пролиферации (таблица 18). В протоковом эпителии количество ИСК увеличивалось относительно нормальных значений, размеры ядра этих клеток уменьшались, а размеры цитоплазмы сохранялись на уровне интактных животных. Содержание инсулина и уровень пролиферации соответствовал норме, а уровень апоптоза значительно снизился (таблица 18).

Таблица 18 – Морфофункциональная характеристика одиночных инсулин-синтезирующих клеток поджелудочной железы экспериментальных животных

Показатель	Интактные животные	АДФН	Аллоксан 30 суток	Аллоксан 60 суток	Аллоксан + АДФН
Ацинарная часть					
Кол-во ИСК / мм ² паренхимы	0,41 ± 0,04	0,34 ± 0,06	0,34 ± 0,05	0,39 ± 0,05	0,32 ± 0,05
Площадь ядра ИСК (мкм ²)	26,6 ± 2,1	23,8 ± 2,0	27,4 ± 1,0	27,9 ± 1,7	23,2 ± 1,8
Площадь цитоплазмы ИСК (мкм ²)	86,4 ± 6,7	107,2 ± 17,1	87,6 ± 2,3	106,3 ± 8,6	106,9 ± 19,3
ЯЦО ИСК	0,32 ± 0,02	0,24 ± 0,04	0,31 ± 0,01	0,27 ± 0,02	0,24 ± 0,03
Интенсивность флюоресценции insulin (усл. ед.)	42,7 ± 3,3	45,0 ± 6,1	39,1 ± 4,9	39,4 ± 5,6	51,9 ± 4,2 ⁴
Кол-во Ki-67 ⁺ ИСК / мм ² ацинарной части паренхимы	0	0	0	0	0
Кол-во TUNEL ⁺ ИСК / мм ² паренхимы	0	0,08 ± 0,02 ¹	0,07 ± 0,02 ₁	0,12 ± 0,03 ¹	0 ^{2,3,4}
Доля TUNEL ⁺ ИСК от общего кол-ва ИСК ацинарной части (%)	0	23,5 ± 7,6 ¹	19,5 ± 2,0 ¹	28,5 ± 3,7 ¹	0 ^{2,3,4}

Протоковый эпителий					
Кол-во ИСК / мм ² паренхимы	0,23 ± 0,02	0,49 ± 0,10 ¹	0,53 ± 0,07 ₁	0,48 ± 0,05 ¹	0,39 ± 0,06 ₁
Площадь ядра ИСК (мкм ²)	24,1 ± 1,6	24,5 ± 0,7	18,5 ± 0,7 ¹	29,3 ± 2,9 ³	26,8 ± 2,4 ³
Площадь цитоплазмы ИСК (мкм ²)	57,5 ± 6,2	53,6 ± 3,9	62,2 ± 5,1	66,2 ± 5,4	52,2 ± 2,6
ЯЦО ИСК	0,48 ± 0,05	0,47 ± 0,03	0,25 ± 0,01 ₁	0,45 ± 0,04 ³	0,52 ± 0,05 ₃
Интенсивность флюоресценции insulin (усл. ед.)	29,6 ± 2,4	40,4 ± 3,9 ¹	37,4 ± 4,3	35,3 ± 3,6	54,4 ± 4,7 _{1,3,4}
Кол-во Ki-67 ⁺ ИСК / мм ² паренхимы	0	0	0	0	0
Кол-во TUNEL ⁺ ИСК в 1 мм ² паренхимы	0,04 ± 0,01	0,08 ± 0,01 ¹	0 ¹	0,15 ± 0,02 _{1,3}	0,08 ± 0,01 _{1,3,4}
Доля TUNEL ⁺ ИСК от общего кол-ва ИСК протокового эпителия (%)	14,9 ± 2,2	16,7 ± 2,4	0 ¹	32,5 ± 5,0 ^{1,3}	19,7 ± 2,2 _{3,4}

Примечание: ИСК – инсулин-секретирующие клетки, АДФН – аминоксидогидрофталазидиона натрия. Статистически значимые отличия ($P \leq 0,05$): 1 – от группы интактных животных, 2 – от группы здоровых животных с введением АДФН, 3 – от группы на 30-е сутки после введения аллоксана, 4 – от группы на 60-е сутки после введения аллоксана.

К 60-м суткам исследования количество ИСК ацинарного эпителия, их морфологические параметры, а также уровень пролиферации и апоптоза соответствовал показателям 30-х суток наблюдения (таблица 18). В протоковом эпителии количество ИСК также не отличалось от предыдущего срока наблюдения, при этом размеры их ядер увеличились до нормальных значений. Пролиферативная активность не изменилась, однако было отмечено выраженное увеличение интенсивности апоптоза относительно как предыдущего срока наблюдения, так и интактных животных (таблица 18).

Сравнительная характеристика ИСК различных инсулин-синтезирующих структур. Сравнительная морфофункциональная характеристика ИСК, локализованных в различных структурах, показала, что через 30 суток после введения аллоксана внеостровковые ИСК обладали

повышенным содержанием инсулина по сравнению с β -клетками панкреатических островков. ИСК агломератов и островков характеризовались сходными параметрами ядра и цитоплазмы. В то же время одиночные ИСК протокового эпителия обладали наименьшим размером ядра, а одиночные ИСК ацинарного эпителия – наибольшей площадью цитоплазмы по сравнению с клетками, островков и агломератов (*таблица 19*). Пролиферирующие ИСК были расположены в панкреатических островках. При этом ИСК различной локализации обладали сходным уровнем апоптоза, за исключением перидуктальной области, где не были выявлены одиночные ИСК вступившие в апоптоз (*таблица 19*).

На 60-е сутки после введения аллоксана ИСК независимо от своей локализации обладали сходными размерами ядер, при этом одиночные ИСК ацинарного эпителия характеризовались наибольшей площадью цитоплазмы. Как и на 30-е сутки, внеостровковые ИСК обладали более высокой синтетической активностью, по сравнению с β -клетками панкреатических островков. Пролиферирующие ИСК были локализованы в панкреатических островках. Вместе с этим наибольшая доля апоптотирующих ИСК выявлялась среди одиночных ИСК (*таблица 20*).

Таблица 19 – Сравнительная морфофункциональная характеристика инсулин-синтезирующих клеток различной локализации в поджелудочной железе животных на 30-е сутки после введения аллоксана

Показатель	Панкреатический островок	Агломерат	Одиночные ИСК		
			Средние значения	Ацинарный эпителий	Перидуктальная область
Площадь ядра ИСК (мкм ²)	26,4 ± 1,3	25,0 ± 1,5	23,1 ± 0,4	27,4 ± 1,0	18,5 ± 0,7 * # \$
Площадь цитоплазмы ИСК (мкм ²)	52,1 ± 2,1	56,5 ± 7,7	74,7 ± 2,7 *	87,6 ± 2,3 *	62,2 ± 5,1 \$
ЯЦИ ИСК	0,52 ± 0,04	0,50 ± 0,09	0,31 ± 0,01 *	0,31 ± 0,01 *	0,25 ± 0,01 * #
Интенсивность флюоресценции insulin (усл. ед.)	18,3 ± 2,7	42,9 ± 3,3 *	38,4 ± 3,8 *	39,1 ± 4,9 *	37,4 ± 4,3 *
Количество Ki-67 ⁺ ИСК /мм ² паренхимы	1,91 ± 0,72	0 *	0 *	0 *	0 *
Доля Ki-67 ⁺ ИСК от общего количества ИСК структуры (%)	5,7 ± 2,7	0 *	0 *	0 *	0 *
Количество TUNEL ⁺ ИСК / мм ² паренхимы	6,3 ± 1,1	0,14 ± 0,03 *	0,03 ± 0,01 *	0,07 ± 0,02 *	0 *, #, \$
Доля TUNEL ⁺ ИСК от общего количества ИСК структуры (%)	21,8 ± 2,4	19,4 ± 2,0	9,6 ± 2,7 *#	19,5 ± 2,0	0 *, #, \$

Примечание: ИСК – инсулин-синтезирующая клетка; ЯЦИ – ядерно-цитоплазматический индекс; * – достоверные различия со значениями панкреатического островка (P≤0,05); # – достоверные различия со значениями агломерата (P≤0,05); \$ – достоверные различия со значениями ацинарного эпителия (P≤0,05).

Таблица 20 – Морфофункциональная характеристика инсулин-синтезирующих клеток различной локализации в поджелудочной железе на 60-е сутки после введения аллоксана

Показатель	Панкреатический островок	Агломерат	Одиночные ИСК		
			Средние значения	Ацинарный эпителий	Перидуктальная область
Площадь ядра ИСК (мкм ²)	24,9 ± 0,7	25,9 ± 1,6	25,0 ± 2,3	27,9 ± 1,7	29,3 ± 2,9
Площадь цитоплазмы ИСК (мкм ²)	66,1 ± 5,2	67,4 ± 6,8	76,3 ± 7,4 *	106,3 ± 8,6 * #	66,2 ± 5,4 \$
ЯЦО ИСК	0,40 ± 0,03	0,40 ± 0,04	0,34 ± 0,03	0,27 ± 0,02 * #	0,45 ± 0,04 \$
Интенсивность флюоресценции insulin (усл. ед.)	17,9 ± 2,3	35,7 ± 4,6 *	35,2 ± 3,7 *	39,4 ± 5,6 *	35,3 ± 3,6 *
Количество Ki-67 ⁺ ИСК /мм ² паренхимы	0,053 ± 0,011	0 *	0 *	0 *	0 *
Доля Ki-67 ⁺ ИСК от общего количества ИСК структуры (%)	2,3 ± 0,5	0 *	0 *	0 *	0 *
Количество TUNEL ⁺ ИСК / мм ² паренхимы	3,3 ± 0,9	0,21 ± 0,05 *	0,14 ± 0,02	0,12 ± 0,03	0,15 ± 0,02
Доля TUNEL ⁺ ИСК от общего количества ИСК структуры (%)	14,9 ± 1,7	15,3 ± 2,2	27,7 ± 6,2 * #	28,5 ± 3,7 *#	32,5 ± 5,0 * #

Примечание: ИСК – инсулин-синтезирующая клетка; ЯЦИ – ядерно-цитоплазматический индекс; * – достоверные различия со значениями панкреатического островка (P≤0,05); # – достоверные различия со значениями агломерата (P≤0,05); \$ – достоверные различия со значениями ацинарного эпителия (P≤0,05).

Исходя из полученных результатов, можно сделать заключение, что при повреждении инсулин-продуцирующей системы аллоксаном все ее компоненты сохранялись, но наблюдались их количественные и качественные изменения.

Панкреатические островки являлись наиболее чувствительными к действию повреждающих факторов структурами, поскольку β -клетки панкреатических островков характеризовались наибольшим уровнем апоптоза, при этом снизилось количество как самих островков, так и их ИСК.

На 30-е сутки после введения аллоксана в панкреатических островках параллельно с уменьшением плотности β -клеток снижалась также их синтетическая активность. К 60-м суткам на фоне стабильно низкого уровня инсулина в β -клетках отмечалось резкое падение их плотности, а также количества самих островков. При этом интенсивность деструкции островков находилась в прямой зависимости от содержания в их клетках инсулина. Прогрессирующая деструкция β -клеток приводила к постепенному выравниванию соотношения островковых (в норме составляющих более 90% от общего количества ИСК) и внеостровковых ИСК (на 60-е сутки их доля составляет 56%).

Детальное исследование внеостровковых ИСК выявило, что на фоне нормального уровня апоптоза ИСК агломератов наблюдается уменьшение как их клеточности, так и количества самих агломератов.

Одиночные ИСК обладали неоднородной реакцией на действие повреждающих факторов, которая зависела от локализации клеток. ИСК ацинарного эпителия демонстрировали устойчивую стабильность их количества и морфофункциональных характеристик, несмотря на повышение уровня их апоптоза.

Реакция ИСК протокового эпителия на данные условия зависела от длительности воздействия стресса. На 30-е сутки наблюдения эти клетки являлись устойчивыми к его действию, отмечалось выраженное падение количества клеток, вступивших в апоптоз, и значительное увеличение их общего

количества. К 60-м суткам, несмотря на повышение апоптоза, их количество сохранялось на уровне предыдущего срока наблюдения.

Необходимо отметить, что на фоне действия повреждающих факторов помимо деструктивно-дегенеративных процессов в инсулин-синтезирующей системе развивались также и компенсаторные процессы. Так, наряду с большей чувствительностью к повреждению β -клетки островков также обладали наибольшей пролиферативной активностью в сравнении с внеостровковыми ИСК. При этом наблюдалась неоднородная реакция островков на повреждение в зависимости от содержания инсулина в их β -клетках. В β -клетках островков I типа, т.е. обладающих максимальной синтетической активностью, увеличивались размеры ядра и цитоплазмы, в то время как их пролиферативная активность значительно снижалась. А в островках III типа на фоне гипертрофии β -клеток наблюдалась активация их пролиферативной активности, хотя она и не компенсировала уровень апоптоза.

К 60-м суткам наблюдалось уменьшение размеров ядра и цитоплазмы β -клеток островков I типа до нормальных значений, в островках II типа, наоборот, увеличивались размеры цитоплазмы β -клеток, тогда как в островках III типа эти параметры сохранялись на уровне 30-х суток. При этом уровень их пролиферации снижался до уровня интактных животных, что может свидетельствовать об истощении компенсаторных процессов.

Нарастающие дегенеративные изменения в инсулин-синтезирующей системе на протяжении всего периода наблюдения (вплоть до 60-х суток) приводили к прогрессирующему снижению концентрации инсулина в периферической крови и формированию хронической гипергликемии. Кроме того, выявлялись признаки хронического воспаления. Все это способствовало снижению массы животных экспериментальных животных, при сохранении массы поджелудочной железы.

4.2.3 – Реакция клеток моноцитарно-макрофагального ряда на повреждение инсулин-синтезирующей системы

Известно, что резидентные макрофаги поджелудочной железы оказывают значительное влияние на создание специфического микроокружения ИСК различной локализации [60]. Кроме того, в наших исследованиях было выявлено, что клетки системы фагоцитирующих мононуклеаров (СФМ) первыми среди иммунокомпетентных клеток реагируют на повреждение инсулин-синтезирующей системы поджелудочной железы. Исходя из этого, возникает вопрос о реакции этих регуляторных клеток на повреждение ИСК как компонента их микроокружения.

Нами было отмечена миграция клеток моноцитарно-макрофагального ряда ($CD68^+$) в паренхиму органа на фоне повреждения ИСК. К 30-м суткам их общее количество в паренхиме увеличилось более чем в 3 раза относительно уровня интактных животных. При этом наибольшая степень увеличения была выявлена в базальной части ацинарных структур, где их плотность увеличилась в 6 раз относительно нормы, а в панкреатических островках и перидуктальной области – в 4 и 3,4 раза соответственно (*таблица 16*).

Вместе с этим на 30-е сутки наблюдалось неоднородное увеличение содержания макрофагов в островках с различной синтетической активностью. Наибольшая макрофагальная инфильтрация (увеличение в 6 раз) была выявлена в островках I типа (с высокой синтетической активностью), а наименьшая (в 4 раза) – в островках III типа (с низкой синтетической активностью) (*таблица 21*).

При этом в ходе корреляционного анализа зависимость между интенсивностью флюоресценции инсулин-позитивной области островка и количеством в нем макрофагов, а также между интенсивностью апоптоза β -клеток и содержанием в их островках макрофагов не выявлялась.

К 60-м суткам наблюдения общая степень макрофагальной инфильтрации и особенности ее распределения в паренхиме органа соответствовали 30-м суткам (*таблица 21*). При этом наблюдалось снижение количества макрофагов в

островках I типа, что привело к выравниванию их содержания в островках с различной синтетической активностью (таблица 21).

Таблица 21 – Распределение клеток системы фагоцитирующих мононуклеаров в 1 мм² паренхимы поджелудочной железы экспериментальных животных

Показатель	Интактные животные	АДФН	Аллоксан 30 суток	Аллоксан 60 суток	Аллоксан + АДФН
Паренхима	20 ± 1	19,7 ± 2,4	75 ± 8 ¹	69 ± 5 ¹	18,0 ± 3,2 _{3,4}
Островковая часть (N / 1 мм ² паренхимы)					
Среднее кол-во	0,39 ± 0,04	0,26 ± 0,02 ₁	3,1 ± 0,2 ¹	2,1 ± 0,3 ¹	1,1 ± 0,2 _{1,2,3,4}
ПО I типа	0,33 ± 0,06	0,19 ± 0,04 ₁	5,71 ± 0,52 ₁	2,57 ± 0,43 _{1,2}	1,22 ± 0,16 _{1,2,3,4}
ПО II типа	0,38 ± 0,07	0,18 ± 0,04 ₁	3,52 ± 0,36 ₁	2,07 ± 0,33 _{1,2}	1,13 ± 0,18 _{1,2,3,4}
ПО III типа	0,51 ± 0,05	0,44 ± 0,05 _{1* #}	2,04 ± 0,19 _{1*}	1,87 ± 0,36 ₁	0,68 ± 0,18 _{1,2,3,4}
Экзокринная часть (N / 1 мм ² паренхимы)					
Общее кол-во	19 ± 1	19,1 ± 2,8	73 ± 8 ¹	67 ± 6 ¹	16,7 ± 3,0 _{3,4}
Ацинарная часть	7 ± 1	7,1 ± 1,0	41 ± 4 ¹	35 ± 3 ¹	5,8 ± 1,0 ^{3,4}
Перидуктальная часть	12 ± 1	12 ± 2	32 ± 4 ¹	32 ± 4 ¹	12 ± 1 ^{3,4}

Примечание: ПО – панкреатический островок, АДФН – аминоксидогидрофталазидиона натрия. Статистически значимые отличия (P≤0,05): 1 – от группы интактных животных, 2 – от группы здоровых животных с введением АДФН, 3 – от группы на 30-е сутки после введения аллоксана, 4 – от группы на 60-е сутки после введения аллоксана.

Также в ходе корреляционного анализа не было выявлено связи количества макрофагов в островках и содержанием в них инсулина или уровнем апоптоза их β-клеток. Однако, определялась обратная корреляционная зависимость между степенью макрофагальной инфильтрации островка и количеством пролиферирующих β-клеток в нем (R Спирмена = -0,9 при P<0,05).

Помимо моноцитарно-макрофагальной инфильтрации в паренхиме поджелудочной железы на 30-е сутки повышался уровень про-воспалительных

цитокинов (IL-1 α , IL-6 и INF γ) и инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1) (таблица 22). К 60-м суткам концентрации IL-1 α , IL-6 и IGF-1 не изменялись, а INF γ – снижался в два раза, хотя и оставался значительно выше нормы. При этом содержание фактора некроза опухоли (TNF α) и интерлейкина-10 (IL-10) возрастали относительно значений интактных животных и предыдущего срока наблюдения (таблица 22).

Таблица 22 – Уровень цитокинов в тканях поджелудочной железы экспериментальных животных

Показатель	Интактные животные	АДФН	Аллоксан 30 суток	Аллоксан 60 суток	Аллоксан + АДФН
IL-1 α (пг/мл)	477 \pm 30	246 \pm 40 ¹	4 813 \pm 865 ¹	6 802 \pm 1 466 ¹	1 919 \pm 180 ^{1,2,3,4}
IL-6 (пг/мл)	605 \pm 65	478 \pm 50	1 196 \pm 89 ¹	1 039 \pm 96 ¹	617 \pm 55 ^{3,4}
INF γ (пг/мл)	3 845 \pm 471	2 664 \pm 307	23 318 \pm 2 580 ¹	10 566 \pm 882 ^{1,3}	5 551 \pm 593 ^{2,3,4}
TNF α (пг/мл)	110 \pm 21	74 \pm 9	181 \pm 35	1 392 \pm 282 ^{1,3}	1 845 \pm 138 ^{1,2,3}
IL-10 (пг/мл)	1 062 \pm 119	1 912 \pm 214 ¹	1 068 \pm 69	2 173 \pm 145 ^{1,3}	1 116 \pm 121 ^{2,4}
IGF-1 (пг/мл)	1 729 \pm 528	1 912 \pm 214	6 274 \pm 551 ¹	6 585 \pm 561 ¹	5 374 \pm 460 ^{1,2}

Примечание: АДФН – аминоксидогидрофталазидиона натрия. Статистически значимые отличия ($P \leq 0,05$): 1 – от группы интактных животных, 2 – от группы здоровых животных с введением АДФН, 3 – от группы на 30-е сутки после введения аллоксана, 4 – от группы на 60-е сутки после введения аллоксана.

Полученные результаты свидетельствуют, что повреждение инсулин-синтезирующей системы поджелудочной железы приводит к инфильтрации ее паренхимы клетками системы фагоцитарных мононуклеаров. Наибольшее их количество определялось в базальной части ацинусов. При этом степень инфильтрации ПО зависила от срока исследования. Так, на 30-е сутки наибольшее количество клеток системы фагоцитарных мононуклеаров выявлялось в островках I типа (с высоким уровнем синтеза инсулина), а к 60-м суткам их содержание становилось равномерным среди островков различных типов.

На фоне выраженной макрофагальной инфильтрации в паренхиме поджелудочной железы параллельно с нарастанием степени повреждения повышалось содержание про-воспалительных цитокинов. Сначала (на 30-е сутки наблюдения) повышался уровень IL-1 α , IL-6 и INF γ , при этом компенсаторно возрастала концентрация IGF-1, а к 60-м суткам повысился также TNF α и IL-10.

Резюме

Полученные данные свидетельствуют, что после трехкратного с однодневным интервалом введения аллоксана, в общей дозе 30 мг/100г массы тела животного, наблюдается существенное постепенное нарастание уровня глюкозы в течение всего срока наблюдения (60 суток), которое вызвано снижением концентрации инсулина в результате деструкции ИСК.

Поскольку общепризнано, что непосредственное токсическое действие аллоксана длится в течение нескольких минут [130], то логично предположить, что он выступает в качестве триггера каскада эндогенных факторов, повреждающих инсулин-синтезирующую систему.

В качестве одного из таких повреждающих факторов можно привести эффект гипергликемии, которая развивается уже на 3-и сутки после введения аллоксана и к 7-м суткам наблюдения уровень глюкозы превышает 20 мМоль/л. Доказано, что при таком уровне гипергликемии значительно снижаются синтез и секреция инсулина β -клетками в ответ на глюкозу [131, 143], что, в свою очередь, способствует повышению концентрации глюкозы в крови. Кроме того, в условиях снижения количества и функциональной активности β -клеток повышается количество α -клеток в островке и уровень глюкагона в крови, который угнетает синтез инсулина [84]. Недоступность глюкозы для метаболизма в инсулинозависимых тканях организма, развивающаяся в результате инсулиновой недостаточности, приводит к компенсаторному повышению содержания и кортикостерона [22]. При этом совместное действие контринсулярных гормонов вызывает активацию глюконеогенеза в печени,

почках и кишечнике [15] и соответственно еще большее нарастание гипергликемии.

В условиях хронической гипергликемии глюкоза подвергается самоокислению с образованием двух токсических субстанций – α -кетоальдегида, который участвует в гликозилировании белков, и активных радикалов, вызывающих повреждение мембран и ДНК, что, в свою очередь, запускает апоптоз β -клеток [141, 158].

В качестве другого фактора может выступать изменение микроокружения ИСК, в основе которого лежит нарушение микро- и макроциркуляции [158], а также развитие выраженного воспаления в паренхиме поджелудочной железы. Последнее проявляется в макрофагальной инфильтрации и повышении уровня про- и противовоспалительных цитокинов.

Образующиеся в результате гибели ИСК (некроз и апоптоз) факторы [129], а также секретлируемые оставшимися клетками белки стресса (S100A8 и IL-1) [105, 142] являются хемоаттрактантами для иммунокомпетентных клеток, мигрирующих в паренхиму органа [105]. При этом на 30-е и 60-е сутки после введения аллоксана наибольшее количество макрофагов выявляется в островках и ацинарной части, где наблюдается наибольшая степень деструкции ИСК. Кроме того, увеличение количества клеток СФМ в поджелудочной железе обусловлено не только миграцией моноцитов в зону повреждения, но и активацией пролиферации резидентных макрофагов, стимулированной гипергликемией [125, 157]. При этом инфильтрирующие моноциты/макрофаги характеризуются M1 профилем активации [75], что проявляется повышением концентрации провоспалительных цитокинов (IL-1 α , IL-6 и TNF α) в строме. Воспалительный характер мигрирующих клеток может быть обусловлен действием гипергликемии, стимулирующей макрофаги к секреции активных радикалов (NO \bullet и O $_2$ \bullet) и про-воспалительных цитокинов [125]. Последние, в свою очередь, запускают апоптоз / некроз инсулиноцитов [125, 136] и угнетение синтеза и секреции инсулина в ответ на глюкозу [105, 177].

Кроме того, хроническая гипергликемия сопровождается гликозилированием гуморальных факторов и структурных белков, что приводит к нарушению выполняемой ими функции и изменению антигенного «образа» клеток [194]. Это, в свою очередь, вызывает миграцию лимфоцитов, о чем косвенно свидетельствует резкое увеличение концентрации интерферона- γ (INF γ). Последний обладает цитотоксическим действием, повышает фагоцитарную и воспалительную функцию моноцитов/макрофагов [196].

Согласно полученным результатам, деструкция структур инсулин-синтезирующей системы (панкреатических островков, одиночных ИСК ацинарного и протокового эпителия, а также их агломератов) является неравномерной. Наибольшим дегенеративным изменениям подвержены панкреатические островки, ИСК которых реагируют не только активацией апоптоза, но и снижением своей синтетической активности. При этом прослеживается разнонаправленная зависимость пролиферативной активности β -клеток и уровня их апоптоза с содержанием инсулина в клетках островка: пролиферация имеет обратный характер зависимости, а апоптоз – прямой.

Кроме того, характер повреждения островков также зависит от времени. На начальной стадии (30-е сутки) в большей степени наблюдается снижение их синтетической активности, тогда как к 60-м суткам преобладает деструкция, приводящая к снижению количества островков.

Более интенсивная деструкция островковых клеток в сравнении с внеостровковыми ИСК может быть объяснена с нескольких позиций:

1. Панкреатический островок обладает большей (в 5-10 раз) плотностью капилляров по сравнению с экзокринной частью органа [91], что обеспечивает большую концентрацию аллоксана и других повреждающих факторов в микроокружении β -клеток островка и, соответственно, более сильное повреждающее действие.

2. Дегенеративные изменения островкового аппарата и снижение синтетической активности β -клеток, вызванные действием аллоксана, усугубляются нарушениями в архитектуре островка и межклеточных

взаимодействий в нем. Так, показано, что неагрегированные β -клетки панкреатического островка секретируют инсулин в ответ на стимуляцию глюкозой в значительно меньшем объеме, чем клетки, входящие в состав островка [161]. Более того, в условиях снижения количества β -клеток в островках повышается активность δ -клеток, увеличивается количество α -клеток, а секретируемые ими глюкагон и соматостатин оказывают угнетающее действие на функциональную и пролиферативную активность β -клеток [84].

3. Внеостровковые ИСК обладают более высокой способностью к самообновлению в условиях токсического воздействия (дифференцировка клеток-предшественников в протоковом эпителии и транс-дифференцировка ацинарного эпителия) по сравнению с островковыми клетками.

Вместе с этим, необходимо отметить, что помимо дегенеративных процессов в условиях повреждения инсулин-синтезирующей системы отмечается включение компенсаторно-репаративных механизмов.

Исследование функциональной активности панкреатических островков демонстрирует формирование некоторой специфики развивающихся в них компенсаторных механизмов. В островках с низким содержанием инсулина β -клетки повышают свою пролиферативную активность, а в островках с высоким содержанием инсулина отмечается угнетение пролиферации β -клетки.

При этом островки с высокой синтетической активностью β -клеток характеризуются наибольшей их плотностью на протяжении всего срока наблюдения. Это позволяет предположить, что для поддержания высокой синтетической активности β -клеток необходимо сохранение достаточной плотности в островке, что подтверждается данными литературы [161].

Наиболее устойчивыми к действию повреждающих факторов являются ИСК агломератов, поскольку уровень их апоптоза и интенсивность флюоресценции инсулин-позитивной области клеток соответствует интактным животным на протяжении всего срока наблюдения.

Морфологическое исследование одиночных ИСК демонстрирует значительное увеличение их количества в протоковом эпителии. Это

свидетельствует об усилении процесса дифференцировки клеток-предшественников, локализованных в составе протокового эпителия [144]. Также сохранение плотности одиночных ИСК ацинарного эпителия на уровне интактных животных при значительном увеличении их апоптоза свидетельствует об активации процесса транс-дифференцировки ацинарных эпителиоцитов в ИСК. Кроме того, необходимо отметить, что синтетическая активность внеостровковых ИСК является устойчивой к действию повреждающих факторов.

В активации описанных репаративных процессов во внеостровковой части инсулин-синтезирующей системы в числе прочего играют роль и резидентные противовоспалительные макрофаги (M2) экзокринной части поджелудочной железы, которые не меняют свою функциональную поляризацию в условиях гипергликемии [64]. При этом наблюдаемое нами повышение концентрации противовоспалительных цитокинов (IL-10 и IGF-1) свидетельствует об увеличении их количества и/или секреторной активности. Этот вывод подтверждается литературными данными о стимулирующем влиянии хронической гипергликемии на митотическую активность моноцитов/макрофагов [134].

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что на фоне повреждения ИСК различных структур инсулин-синтезирующей системы имеет место существенная перестройка их микроокружения. Это дает основания для поиска методов воздействия на него с целью протекции эндокриноцитов.

Список опубликованных работ по результатам 4 главы:

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК РФ и/или индексируемых в МБД цитирования Scopus, WoS, PubMed

1. Влияние макрофагов на инсулин синтезирующую систему в норме и при патологии / Т.С. Булавинцева, Б.Г. Юшков, И.Г. Данилова, М.Т. Абидов //

Медицинская иммунология. – 2023. – Т. 25, № 2. – С. 289-302. doi: 10.15789/1563-0625-ИОМ-2534. (Q4, IF Scopus – 0,6; ИФ РИНЦ – 0,559, K1).

2. Особенности развития компенсаторных процессов в инсулинсинтезирующей системе при аллоксановом диабете / Т.С. Булавинцева, Б.Г. Юшков, Л.В. Соколова, И.Г. Данилова // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2018. – Т. 104, № 11. – С. 1291-1300. doi: 10.1134/S0869813918110031. (PubMed; ИФ РИНЦ - 0.64).

3. Цитокиновая регуляция регенераторных процессов в поджелудочной железе при аллоксановом сахарном диабете у крыс и его коррекции соединениями ряда 1,3,4-тиадиазина и липоевой кислотой / И.Г. Данилова, В.В. Емельянов, И.Ф. Гетте, С.Ю. Медведева, Т.С. Булавинцева, М.В. Черешнева, Л.П. Сидорова, В.А. Черешнев, К.В. Соколова // Медицинская иммунология. – 2018. – Т. 20, № 1. – С. 35-44. doi: 10.15789/1563-0625-2018-1-35-44. (Q4, IF Scopus – 0,6; ИФ РИНЦ – 0,559).

4. Взаимосвязь структура-активность в ряду 1,3,4-6Н-тиадиазинов, корригирующих метаболические нарушения при экспериментальном сахарном диабете / В.В. Емельянов, А.В. Иванов, Е.А. Саватеева, Л.П. Сидорова, Т.А. Цейтлер, И.Ф. Гетте, Т.С. Булавинцева, И.Г. Данилова, Н.Е. Максимова, Н.Н. Мочульская, О.Н. Чупахин, В.А. Черешнев // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2017. – № 10. – С. 1873-1875. (Q3, IF Scopus - 2.6; WOS – Q3; ИФ РИНЦ – 0,794).

5. Особенности структуры миокарда в ранние сроки развития диабета / И.Г. Данилова, С.В. Ломаева, Т.С. Булавинцева, К.В. Соколова // Здоровье, демография, экология финно-угорских народов. – 2017. – № 3. – С. 55-58. (ИФ РИНЦ – 0,144).

6. 2-морфолино-5-фенил-6Н-1,3,4-тиадазин корригирует метаболические нарушения при формировании аллоксанового сахарного диабета у крыс / В.В. Емельянов, Е.А. Саватеева, Л.П. Сидорова, Т.А. Цейтлер,

И.Ф. Гетте, **Т.С. Булавинцева**, С.Е. Смирных, Н.Е. Максимова, Н.Н. Мочульская, О.Н. Чупахин, В.А. Черешнев // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2016. – Т. 162, № 7. – С. 42-45. (*Q3, IF Scopus – 1,4; WOS – Q4; PubMed; ИФ РИНЦ – 0,659*).

7. Атомно-силовая микроскопия эритроцитов и метаболические нарушения при экспериментальном сахарном диабете и его коррекции липоевой кислотой / В.В. Емельянов, Д.В. Леонтьев, А.В. Ищенко, **Т.С. Булавинцева**, Е.А. Саватеева, И.Г. Данилова // Биофизика. – 2016. – № 5. – С. 922–926. (*Q4, IF Scopus – 1,2; PubMed; ИФ РИНЦ – 0,843*).

8. Реакции системы фагоцитирующих мононуклеаров на хроническую гипергликемию / **Т.С. Булавинцева**, И.Г. Данилова, С.А. Бриллиант, С.Е. Смирных, М.Т. Абидов // Биофизика. – 2016. – № 5. – С. 936–940. (*Q4, IF Scopus – 1,2; PubMed; ИФ РИНЦ – 0,843*).

9. Реакция тучных клеток на повреждение печени при аллоксановом диабете у крыс / Н.Б. Блинкова, И.Г. Данилова, И.Ф. Гетте, С.Е. Смирных, З.А. Пьянкова, **Т.С. Булавинцева** // Российский иммунологический журнал. – 2016. – № 2 (1). – С. 543-545. (*ИФ РИНЦ - 0.225*).

10. Morphological restructuring of myocardium during the early phase of experimental diabetes mellitus / I.G. Danilova, P.A. Sarapultsev, S.U. Medvedeva, I.F. Gette, **T.S. Bulavintceva**, A.P. Sarapultsev // Anat. Rec. (Hoboken). – 2015. – Vol. 298, № 2. – P. 396-407. doi: 10.1002/ar.23052. (*Q2, IF Scopus – 4,3; WOS – Q2; PubMed*).

11. Токсическое действие аллоксана в динамике развития аллоксанового диабета / С.Ю. Медведева, **Т.С. Булавинцева**, И.Г. Данилова, И.Ф. Гетте, В.Г. Сенцов // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2012. – № 3. – С. 30-33. (*ИФ РИНЦ – 0,225*).

ГЛАВА 5 – ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ МИКРООКРУЖЕНИЯ (РЕЗИДЕНТНЫХ МАКРОФАГОВ) НА ИНСУЛИН-СИНТЕЗИРУЮЩУЮ СИСТЕМУ В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ И ПРИ ЕЕ ПОВРЕЖДЕНИИ

Макрофаги поджелудочной железы играют значительную роль в регуляции тканевого гомеостаза инсулин-синтезирующей системы, более того, они одними из первых реагируют на ее повреждение. Это дает основание предположить возможность влияния на синтетическую функцию ИСК и интенсивность регенераторных процессов путем воздействия на макрофаги как компонент их микроокружения.

Кроме того, клетки моноцитарно-макрофагального ряда первыми реагируют на повреждение ИСК – повышается содержание моноцитов в периферической крови и моноцитарно-макрофагальная инфильтрация паренхимы поджелудочной железы. При этом наибольшее скопление провоспалительно активированных клеток системы фагоцитирующих мононуклеаров (СФМ) определяется в областях с наибольшим уровнем апоптоза ИСК, т.е. в панкреатических островках и ацинарном эпителии. Данная закономерность свидетельствует о вовлеченности макрофагов в процесс деструкции ИСК и позволяет предположить, что направленное воздействие на СФМ будет оказывать влияние на морфологию и функциональную активность инсулин-синтезирующей системы в физиологических условиях, а также на развитие компенсаторно-приспособительных процессов при ее повреждении.

Исходя из провоспалительной направленности активации инфильтрирующих поджелудочную железу макрофагов, в качестве инструмента воздействия на них был выбран противовоспалительный препарат на основе аминодигидрофталазида натрия (АДФН). Основной точкой приложения действия данного препарата является СФМ, он снижает секрецию активных

форм кислорода и про-воспалительных цитокинов (TNF α , IFN γ и IL-6) активированными макрофагами [100, 114, 115, 180].

5.1 – Общая характеристика животных после введения препарата аминодигидрофтазилона натрия

Модуляция функциональной активности клеток СФМ с помощью препарата АДФН в физиологических условиях не приводила к изменению поведения, общего веса (*рисунок 15*) и показателей углеводного обмена в крови экспериментальных животных (*таблица 8*).

В условиях повреждения инсулин-синтезирующей системы введение препарата АДФН способствовало увеличению общего веса животных в отличие от контрольной группы, т.е. без введения препарата, на том же сроке наблюдения (*рисунок 15*). В отличие от нелеченных животных, в группе с введением АДФН отмечалось сохранение концентрации инсулина в периферической крови на уровне 30-х суток наблюдения, снижение концентрации глюкозы в 1,5 раза относительно предыдущего срока исследования и нормализация доли гликозилированного гемоглобина. При этом концентрация кортикостерона статистически не отличалась от значений групп животных с без введения препарата (*таблица 8*).

5.2 – Реакция клеток моноцитарно-макрофагального ряда на введение препарата аминодигидрофталазилона натрия

Физиологические условия

Введение препарата АДФН в физиологических условиях способствовало снижению абсолютного и относительного количества лимфоцитов периферической крови на фоне сохранения общего содержания лейкоцитов. В результате этого увеличивалась доля гранулоцитов, а доля моноцитов и лимфоцитов уменьшалась (*таблица 9*). Вместе с этим, в крови снижались уровни IL-1 α , IFN γ и IGF-1 (*таблица 10*).

В поджелудочной железе отмечалось неравномерное снижение плотности макрофагов в панкреатических островках на фоне сохранения их количества в экзокринной части органа на уровне интактных животных (*таблица 21*). Наибольшая степень снижения наблюдалась в островках с высоким содержанием инсулина. Это приводило к формированию обратной корреляционной зависимости между содержанием макрофагов и интенсивностью флюоресценции инсулина в островках (R Спирмена = 0,6 при $P=0,01$), в отличие от интактных животных, где они распределялись равномерно. Кроме того, в тканях органа уменьшалась концентрация IL-1 α , а концентрация IL-10 – увеличивалась (*таблица 22*).

Повреждение инсулин-синтезирующей системы

В условиях патологии АДФН приводило к нормализации гематологических показателей периферической крови. В отличие от контрольных животных без лечения, снижалось общее количество лейкоцитов и нормализовалось их соотношение. При этом было отмечено повышение уровня гемоглобина относительно не только животных с повреждением, но и интактных животных (*таблица 9*).

Кроме того, введение препарата предотвращало повышение в периферической крови концентрации провоспалительных цитокинов (IL-6, INF γ и TNF α), при этом содержание IL-6 и INF γ уменьшалось также относительно интактных животных. Напротив, содержание IL-10 увеличивалось в большей степени, чем в группе без лечения на 60-е сутки (*таблица 10*).

В поджелудочной железе отмечалось снижение общего количества макрофагов до уровня интактных животных, хотя в панкреатических островках их количество оставалось выше нормальных значений. Анализ распределения клеток СФМ в островках с различным содержанием инсулина в β -клетках свидетельствовал о равномерном их распределении, в отличие от животных без введения препарата, где наибольшая степень инфильтрации выявлялась в островках I и II типа, т.е. с высокой и средней интенсивностью флюоресценции инсулина (*таблица 21*).

На фоне общего снижения количества макрофагов в поджелудочной железе наблюдалось также уменьшение концентраций про-воспалительных цитокинов (IL-1 α , IL-6 и INF γ) до нормальных значений. Исключение составлял IL-1 α , его уровень значительно снижался относительно группы крыс с повреждением на 30-е сутки, но оставался выше значений интактных животных. Содержание TNF α повышалось так же, как в группе не леченных животных, независимо от действия АДФН (*таблица 22*).

Таким образом, как в физиологических условиях, так и при повреждении инсулин-синтезирующей системы, введение препарата АДФН способствовало снижению уровня показателей воспаления. Это согласуется с данными литературы.

5.3 – Характеристика инсулин-синтезирующей системы поджелудочной железы

Физиологические условия

В физиологических условиях наблюдаемые изменения в иммунологических показателях не приводили к значительным изменениям общих параметров и морфологической структуры поджелудочной железы (*таблица 11; рисунок 16*) в сравнении с интактными животными.

В паренхиме органа сохранялось общее количество структур, синтезирующих инсулин, и отношение островков к внеостровковым структурам на уровне интактных животных (1 : 1,4 у крыс с АДФН и 1 : 1,5 у интактных) (*рисунок 17*). Содержание и соотношение ИСК различной локализации также соответствовало интактным животным (*таблица 12*).

Повреждение инсулин-синтезирующей системы

Снижение уровня показателей воспаления в условиях повреждения также не привело к изменению относительного количества сухого вещества поджелудочной железы и доли эндокринной ткани в ней относительно 30-х суток наблюдения и интактных животных. А отношение массы органа к общему весу

животного, как и в контроле без введения АДФН, превышало нормальные значения (*таблица 11*).

В ходе исследования морфологической структуры органа было выявлено уменьшение дистрофических изменений во всех его отделах (сосудистое русло, экзокринная и эндокринная части) в сравнении с контрольными животными без введения АДФН (*рисунок 16*).

Сосудистое русло. Сохранялось полнокровие трабекулярных сосудов, в части сосудов присутствовали сладж-комплексы, при этом, в отличие от группы животных без введения препарата, отсутствовали склеротические явления (*рисунок 16*).

Ацинарная часть. Морфологическая структура ацинусов соответствовала гистологической картине интактных животных, ацинарные клетки обладали хорошо выраженной полярностью базальной и апикальной части (*рисунок 16*).

Панкреатические островки обладали округлой формой, и в отличие от животных без введения АДФН на том же сроке исследования, у них хорошо определялась капсула, отделяющая островок от экзокринной части, однако, присутствовали единичные клетки с признаками деструкции (*рисунок 16*).

Общее количество инсулин-синтезирующих структур сохранялось на уровне интактных животных и превышало значение контрольных животных на том же сроке наблюдения почти в 2 раза. При этом содержание панкреатических островков было снижено относительно нормы и соответствовало 30-м суткам наблюдения. Плотность агломератов ИСК в два раза превышала уровень такового не только у крыс без лечения, но и у интактных животных. В то же время количество одиночных ИСК значимо не отличалось ни от интактных, ни от контрольных животных (*рисунок 17А*). При этом на 30-е сутки соотношение внеостровковых инсулин-синтезирующих структур и островков было уравновешено (1:1,2), так же как у контрольных животных (*рисунок 17Б*).

Общее количество ИСК также находилось на уровне 30-х суток наблюдения, при этом значительно увеличилось количество клеток, локализованных в составе агломератов. Анализ соотношения ИСК различной

локализации свидетельствовал о некотором снижении доли ИСК островков в результате роста количества ИСК агломератов. Однако, в отличие от группы без лечения на том же сроке наблюдения, на островки приходилось 90% ИСК от общего их количества (*таблица 12*).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что снижение показателей воспаления в периферической крови и в паренхиме поджелудочной железы в физиологических условиях не влияет на морфологическую структуру органа, а также на количество и соотношение инсулин-синтезирующих структур. Напротив, в условиях повреждения это способствует снижению деструктивно-дегенеративных явлений в экзокринной и эндокринной частях органа. При этом сохраняется общее количество инсулин-синтезирующих структур и клеток, повышается содержание агломератов.

5.3.1 – Морфофункциональная характеристика панкреатических островков

Физиологические условия

Модуляция условий микроокружения инсулин-синтезирующей системы в физиологических условиях привела к изменению морфофункциональных параметров панкреатических островков. На фоне сохранения их размеров, общей клеточности и количества β -клеток отмечалось уменьшение размеров ядра последних на фоне значительного увеличения размеров их цитоплазмы. При этом увеличился уровень апоптоза β -клеток относительно интактных животных (*таблица 13*).

Также выявлялась неоднородность реакции островков с различным содержанием инсулина. Так, менялось их соотношение: доля островков I типа снижалась, в то время как доля островков II типа пропорционально увеличивалась (*рисунок 18*). Кроме того, наблюдалось изменение их морфофункциональных характеристик в сравнении с интактными животными.

В островках I типа (с высоким содержанием инсулина в их β -клетках) повышалась доля β -клеток. При этом снижалась интенсивность их

пролиферации, а апоптоза – повышалась, что привело к снижению соотношения процессов пролиферации и апоптоза β -клеток относительно интактных крыс. Снижалось и ядерно-цитоплазматическое отношение β -клеток (*таблица 14*).

В островках II типа (со средним содержанием инсулина) увеличивался размер островков и содержание в них β -клеток. Как и в островках I типа, в островках II типа снижалось ядерно-цитоплазматическое отношение β -клеток за счет уменьшения размеров ядра. Пропорционально увеличивалась интенсивность их пролиферации и апоптоза, что способствовало сохранению их соотношения равным единице (*таблица 15*).

В островках III типа (с низким содержанием инсулина), также, как и в островках II типа, наблюдалось снижение размеров ядра и, соответственно, ядерно-цитоплазматического отношения у β -клеток. При этом интенсивность процессов пролиферации и апоптоза β -клеток соответствовала интактным животным (*таблица 16*).

Эти неравномерные изменения интенсивности пролиферации и апоптоза β -клеток в островках с различным содержанием инсулина привели к тому, что компенсация апоптоза β -клеток их пролиферацией наблюдалась только в островках со средним содержанием инсулина, тогда как в островках I и III типа соотношение этих процессов значительно было сдвинуто в сторону преобладания апоптоза. Однако, несмотря на это, на данном сроке наблюдения все типы островков содержали одинаковое количество ИСК (*рисунок 21*).

Необходимо отметить, что наибольшие изменения морфофункциональных параметров выявлялись в островках с высоким и средним содержанием инсулина в их β -клетках и именно в них отмечалась наибольшая степень снижения плотности макрофагов – соответственно, в 2 и 2,6 раза относительно нормы (*таблица 21*). А в островках III типа, где количество макрофагов снижались в 1,4 раза от уровня интактных животных (*таблица 21*), данные параметры сохранялись без изменений (*таблица 14*).

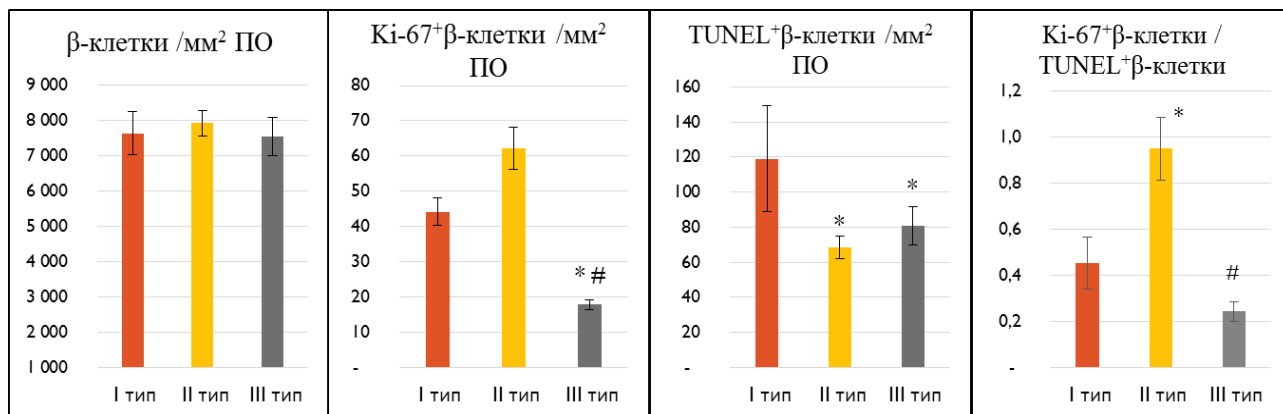


Рисунок 21 – Соотношение процессов пролиферации и апоптоза β -клеток в панкреатических островках различного типа у крыс с введением АДФН в физиологических условиях

Примечание: ПО – панкреатические островки. Статистически значимые отличия ($P < 0,05$): * – от значений островков I типа (с высоким уровнем флюоресценции инсулина), # – от значений островков II типа (со средним уровнем флюоресценции инсулина).

Как и у интактных животных, прослеживалась прямая корреляционная связь между интенсивностью флюоресценции инсулин-позитивной области островков и пролиферативной активностью их β -клеток (Коэффициент Спирмена $R=0,56$ при $P=0,04$) и не было связи уровня апоптоза β -клеток с уровнем флюоресценции их инсулина ($R=0,43$ при $P=0,13$). При этом выявлялась обратная зависимость между содержанием макрофагов в островке и содержанием инсулина в его β -клетках ($R= -0,76$ при $P=0,002$).

Повреждение инсулин-синтезирующей системы

Модуляция функциональной активности СФМ способствовала увеличению количества β -клеток в островках относительно 30-х суток наблюдения, тогда как в контрольной группе на 60-е сутки без АДФН их содержание снижалось в 2 раза. В то же время общая клеточность и размеры островков не менялись и соответствовали значениям интактных животных (таблица 13).

Также в β -клетках повышалось содержание инсулина в 1,5 раза относительно интактных животных и в 2,5 раза относительно животных без введения препарата. Размеры ядра β -клеток были увеличены относительно интактных животных и группы с введением АДФН в физиологических условиях.

А площадь их цитоплазмы превышала норму и значения контрольных животных с повреждением инсулин-синтезирующей системы (*таблица 13*).

Количество пролиферирующих β -клеток статистически не отличалось от уровня 30-х суток наблюдения и интактных животных, тогда как в группе без лечения отмечалось снижение данного показателя в 2 раза. В то же время значительно уменьшалось содержание β -клеток, вступивших в апоптоз, хотя и не до уровня интактных животных. Эти изменения привели к повышению соотношения процессов пролиферации и апоптоза относительно животных без введения препарата (*таблица 13*).

Анализ количественного распределения панкреатических островков с различной синтетической активностью продемонстрировал, что на фоне сохранения общего количества островков на уровне 30-х суток наблюдения, отмечалось изменение их соотношения. Увеличивалось количество островков с высокой синтетической активностью и уменьшалось число островков с низким содержанием инсулина (*рисунок 18*). В результате, их соотношение близко к интактным животным (*рисунок 18, таблицы 14-16*).

Кроме изменения соотношения панкреатических островков с различной синтетической активностью выявлялись также морфофункциональные изменения в островках каждого типа. Так, островки с высокой синтетической активностью (I типа) характеризовались большим содержанием β -клеток в сравнении с животными на 30-е и 60-е сутки без препарата АДФН (*таблица 14*). Размеры ядра и цитоплазмы β -клеток равномерно увеличивались, в отличие от контрольных животных без введения АДФН, где к 60-м суткам отмечалось их уменьшение. Пролиферативная активность β -клеток увеличивалась до нормальных значений, а интенсивность апоптоза не менялась относительно 30-х суток наблюдения, в отличие от группы животных без лечения, где количество апоптотирующих β -клеток повышалось в сравнении с 30-ми сутками исследования. Вместе с этим соотношение процессов пролиферации и апоптоза в группе с введением АДФН на фоне повреждения значительно снизилось относительно нормы (*таблица 14*).

Размер островков со средней синтетической активностью (II тип) и общее количество клеток в них соответствует интактным животным. Количество β -клеток увеличивалось относительно 30-х суток наблюдения, хотя и оставалось ниже нормы. Размеры их ядра и цитоплазмы превышали нормальные значения, как и у контрольных животных с повреждением. Проллиферативная активность инсулиноцитов значимо не отличалась от значений интактных животных и группы с повреждением на 30-х сутках наблюдения, но превышала уровень контрольной группы без лечения на том же сроке наблюдения в 3 раза. Интенсивность апоптоза также значительно снижалась относительно 30-х суток (*таблица 15*).

В островках с низкой синтетической активностью (III тип) также отмечалось увеличение содержания β -клеток относительно 30-х суток, а размеры ядра и цитоплазмы β -клеток не менялись и превышали интактные значения. При этом наблюдалось усиление их пролиферативной активности относительно не только животных без лечения, но и интактных животных. Уровень апоптоза снижался в сравнении с контрольными животными без АДФН. В результате наблюдалось уравнивание этих процессов, в отличие от групп крыс без введения АДФН и интактных животных (*таблица 16*).

Сравнительный анализ островков с различной синтетической активностью у группы животных с введением препарата АДФН на фоне повреждения инсулин-синтезирующей системы свидетельствовал о равномерном распределении в них β -клеток. При этом островки с низкой синтетической активностью (III тип) содержали наибольшее количество пролиферирующих β -клеток, а островки I типа – наибольшее количество инсулиноцитов, вступивших в апоптоз (*рисунок 22*). При этом, как и у группы крыс с повреждением инсулин-синтезирующей системы, прослеживалась обратная связь пролиферативной активности и содержания инсулина в β -клетках (Коэффициент Спирмена $R = -0,70$ при $P = 0,001$), а также прямая зависимость интенсивности апоптоза от содержания инсулина в β -клетках (Коэффициент Спирмена $R = 0,72$ при $P = 0,007$).

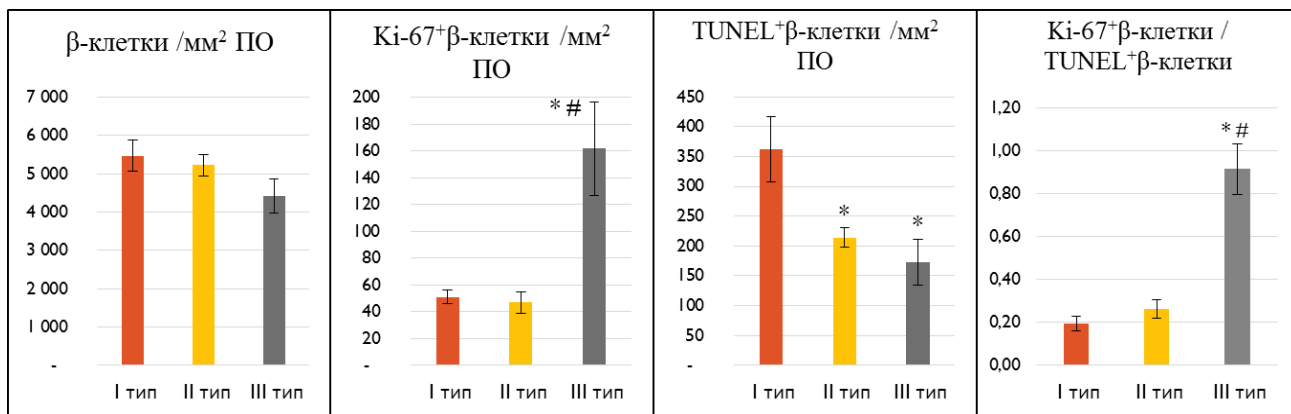


Рисунок 22 – Соотношение процессов пролиферации и апоптоза β-клеток в панкреатических островках с различным содержанием инсулина у экспериментальных животных с введением АДФН на фоне повреждения инсулин-синтезирующей системы

Примечание: ПО – панкреатический островок. Статистически значимые отличия ($P < 0,05$): * – от островков I типа (с высоким уровнем флюоресценции инсулина), # – от значений островков II типа (со средним уровнем флюоресценции инсулина).

Таким образом, во всех панкреатических островках независимо от интенсивности продукции инсулина повышалось количество β-клеток, в последних выявлялись признаки гипертрофии и повышение пролиферативной активности на фоне снижения интенсивности апоптоза.

5.3.2 – Морфофункциональное исследование внеостровковых инсулин-синтезирующих структур поджелудочной железы

Физиологические условия

Модуляция функциональной активности макрофагов в физиологических условиях оказывала выраженное стимулирующее влияние на пролиферацию ИСК агломератов, однако это не сказалось на их клеточности (*таблица 17*) и количестве панкреатических островков (*рисунок 17*) в сравнении с интактными животными. Сами ИСК при этом характеризовались меньшими размерами ядра и цитоплазмы относительно нормальных значений (*таблица 17*).

У одиночных ИСК независимо от локализации не выявлялись пролиферирующие клетки, но при этом повышалась интенсивность их апоптоза. В протоковом эпителии была увеличена интенсивность флюоресценции инсулин-позитивной области ИСК (*таблица 18*).

Повреждение инсулин-синтезирующей системы

В агломератах повышалось содержание ИСК относительно предыдущего срока наблюдения и группы животных без лечения до значений интактных животных (*таблица 17*). При этом, в отличие от группы животных с модуляцией функциональной активности макрофагов у здоровых животных сохранялись нормальными размеры ядер и цитоплазмы их ИСК. Интенсивность флюоресценции инсулин-позитивной области клеток животных с иммуномодуляцией на фоне повреждения была значительно повышена относительно не только контрольных крыс без АДФН, но и интактных животных, что свидетельствует об активации синтетической активности этих клеток. Интенсивность процессов пролиферации и апоптоза ИСК агломератов статистически не отличалась от значений интактных животных и крыс с повреждением инсулин-синтезирующей системы (*таблица 17*).

Количество одиночных ИСК в ацинарном эпителии значимо не отличалось от интактных животных и крыс с повреждением инсулин-синтезирующей системы без введения АДФН. Однако на фоне сохранения размеров их ядра и цитоплазмы, увеличивалось содержание инсулина относительно крыс без введения АДФН до уровня интактных животных. Пролиферирующие и вступившие в апоптоз ИСК в ацинарном эпителии не выявлялись, как и у интактных животных (*таблица 18*).

В протоковом эпителии сохранялось повышенное относительно интактных животных содержание одиночных ИСК. Размеры их ядер увеличивались относительно 30-х суток наблюдения до интактных значений, а содержание инсулина в клетках превышало норму и уровень животных с повреждением. Пролиферирующие ИСК в протоковом эпителии не обнаруживались, но в сравнении с 30-ми сутками наблюдения отмечалось увеличение интенсивности их апоптоза до нормального уровня. Напротив, в группе крыс на 60-е сутки без введения АДФН апоптоз повышался в значительно большей степени (*таблица 18*).

Сравнительная характеристика инсулиноцитов различной локализации в паренхиме поджелудочной железы

В физиологических условиях ИСК агломератов обладали наименьшими размерами ядра и цитоплазмы, а ИСК ацинусов – наибольшими размерами цитоплазмы в сравнении с ИСК другой локализации. Интенсивность флюоресценции инсулина в одиночных ИСК значительно преобладала над интенсивностью в β -клетках островка, ИСК агломератов занимали промежуточное положение. В отличие от интактных животных, пролиферирующие ИСК помимо островков, выявлялись также в агломератах, однако в островках их абсолютное количество было выше. Доля пролиферирующих ИСК от общего их количества в структуре значительно преобладала в агломератах. Уровень апоптоза ИСК был максимален в островках, а среди одиночных клеток он - наименьший. Относительное же его количество в структуре было выше среди одиночных клеток, а наименьшее – в островках (*таблица 23*).

Сравнительная характеристика морфофункциональных особенностей ИСК различной локализации у животных с введением препарата АДФН на фоне повреждения инсулин-синтезирующей системы свидетельствовала, что вне зависимости от локализации все они обладают сходной интенсивностью флюоресценции инсулина, при этом клетки в ацинусах имеют наименьший размер ядра и наибольший размер цитоплазмы (*таблица 24*).

Как и у интактных крыс, у животных с модуляцией функциональной активности макрофагов при повреждении ИСК пролиферирующие ИСК были локализованы только в панкреатических островках, а в составе экзокринного эпителия они не выявлялись. При этом наибольшее абсолютное значение их апоптоза также определялось в островках, а наименьшее – в ацинарном эпителии. Вместе с этим наибольшая доля вступивших в апоптоз ИСК от общего количества ИСК данной локализации выявлялась среди ИСК агломератов и протокового эпителия (*таблица 24*).

Таблица 23 – Морфофункциональная характеристика инсулин-синтезирующих клеток различной локализации в поджелудочной железе животных с модуляцией функциональной активности макрофагов

Показатель	Панкреатический островок	Агломерат	Одиночные ИСК экзокринного эпителия		
			Средние значения	Ацинарный эпителий	Перидуктальная область
Площадь ядра ИСК (мкм ²)	22,1 ± 0,6	20,2 ± 0,6 *	24,8 ± 0,9 #	23,8 ± 2,0 #	24,5 ± 0,7 * #
Площадь цитоплазмы ИСК (мкм ²)	53,4 ± 1,7	37,7 ± 1,7 *	82,0 ± 4,9 * #	107,2 ± 17,1 * #	53,6 ± 3,9 # \$
ЯЦО ИСК	0,41 ± 0,02	0,54 ± 0,03 *	0,31 ± 0,02 * #	0,24 ± 0,04 * #	0,47 ± 0,03 \$
Интенсивность флюоресценции insulin (усл. ед.)	32,8 ± 2,1	39,5 ± 4,9	42,7 ± 2,5 *	45,0 ± 6,1 *	40,4 ± 3,9 *
Количество Ki-67 ⁺ ИСК /мм ² паренхимы	1,2 ± 0,4	0,34 ± 0,11 *	0 *	0 *	0 *
Доля Ki-67 ⁺ ИСК от общего количества ИСК структуры (%)	0,58 ± 0,06	17,0 ± 3,3 *	0 *	0 *	0 *
Количество TUNEL ⁺ ИСК / мм ² паренхимы	0,89 ± 0,09	0,18 ± 0,05 *	0,08 ± 0,02 * #	0,08 ± 0,02 * #	0,08 ± 0,01 * #
Доля TUNEL ⁺ ИСК от общего количества ИСК структуры (%)	0,99 ± 0,06	12,8 ± 1,1 *	20,1 ± 4,9 *	23,5 ± 7,6 *	16,7 ± 2,4 *

Примечание: ИСК – инсулин-синтезирующая клетка; ЯЦИ – ядерно-цитоплазматический индекс. Статистически значимые отличия (P≤0,05):

* – от значений панкреатического островка; # – от значений агломерата; \$ – от значений ацинарного эпителия.

Таблица 24 –Морфофункциональная характеристика инсулин-синтезирующих клеток различной локализации в поджелудочной железе животных с модуляцией функциональной активности макрофагов на фоне повреждения инсулин-синтезирующих клеток

Показатель	Панкреатический островок	Агломерат	Одиночные ИСК экзокринного эпителия		
			Средние значения	Ацинарный эпителий	Перидуктальная область
Площадь ядра ИСК (мкм ²)	27,2 ± 0,7	25,9 ± 0,9	25,0 ± 1,8	23,2 ± 1,8 *	29,3 ± 2,9
Площадь цитоплазмы ИСК (мкм ²)	62,1 ± 3,5	58,0 ± 4,4	73,7 ± 6,3	106,9 ± 19,3 * #	66,2 ± 5,4 \$
ЯЦО ИСК	0,45 ± 0,03	0,45 ± 0,02	0,34 ± 0,02	0,24 ± 0,03 * #	0,45 ± 0,04 \$
Интенсивность флюоресценции insulin (усл. ед.)	48,2 ± 5,3	51,6 ± 4,3	49,1 ± 3,9	51,9 ± 4,2	54,4 ± 4,7
Количество Ki-67 ⁺ ИСК /мм ² паренхимы	1,2 ± 0,4	0 *	0 *	0 *	0 *
Доля Ki-67 ⁺ ИСК от общего количества ИСК структуры (%)	3,4 ± 0,9	0 *	0 *	0 *	0 *
Количество TUNEL ⁺ ИСК / мм ² паренхимы	1,4 ± 0,3	0,42 ± 0,05 *	0,04 ± 0,01 * #	0 * #	0,08 ± 0,01 *, #, \$
Доля TUNEL ⁺ ИСК от общего количества ИСК структуры (%)	4,0 ± 0,4	16,9 ± 3,1 *	5,2 ± 0,5 #	0 * #	19,7 ± 2,2 *, \$

Примечание: ИСК – инсулин-синтезирующая клетка; ЯЦИ – ядерно-цитоплазматический индекс. Статистически значимые отличия (P≤0,05):

* – от значений панкреатического островка; # – от значений агломерата; \$ – от значений ацинарного эпителия.

Резюме

В последние годы все большее распространение получает представление о том, что морфофункциональные характеристики специфических клеток органа во многом зависят от их микроокружения – его биохимического и клеточного состава. Среди клеточного компонента микроокружения инсулин-продуцирующих клеток особое внимание привлекают макрофаги. Они участвуют в регуляции эмбрионального развития поджелудочной железы, поддержании ее гомеостаза [40] и функции, поскольку способны к восприятию метаболических и эндокринных сигналов, экспрессируя на своей поверхности значительное количество нейроэндокринных рецепторов [116]. В числе последних выделяют рецепторы к инсулину и инсулиноподобному фактору роста, грелину, соматостатину, гастрину и др. [116]. Кроме того, клетки СФМ одними из первых реагируют на повреждение инсулин-синтезирующей системы и способны оказывать регуляторное влияние на регенерацию ИСК после их повреждения. Секретируя противовоспалительные цитокины (IL-10, TGF β) и глюкокортикоиды, а также провоспалительные цитокины (TNF, IL-6), они способствуют привлечению регуляторных Т-клеток и развитию Th2 иммунного ответа [73]. Кроме того, они могут также способствовать ангиогенезу и репарации тканей, продуцируя различные факторы роста [38], например, инсулиноподобный фактора роста 1 (IGF-1), которые способствуют пролиферации β -клеток [76, 118] и повышению их жизнеспособности в условиях действия повреждающих факторов [73].

Исходя из этого, можно предположить, что модуляция спектра функциональной активности клеток СФМ может повлиять на синтез инсулина в ИСК, их пролиферацию и апоптоз.

В качестве фармакологического модулятора нами был выбран препарат на основе АДФН, обладающий выраженным противовоспалительным действием [1, 100, 114, 180], основной точкой действия которого считаются клетки моноцитарно-макрофагального ряда [100, 180].

Введение препарата аминодигидрофталазидиона натрия здоровым крысам способствует снижению содержания лимфоцитов, а также уровня IL-1 α , INF γ и IGF-1 в периферической крови. Это является проявлением его противовоспалительного действия.

В поджелудочной железе при сохранении общего количества макрофагов в органе снижается их содержание в панкреатических островках, где макрофаги характеризуются провоспалительным профилем активации. При этом наибольшая степень снижения выявляется в островках с высоким и средним содержанием инсулина. Кроме того, в паренхиме органа происходит также уменьшение концентрации IL-1 α при повышении содержания IL-10.

Реакция инсулин-синтезирующих структур на изменение условий их микроокружения является неоднородной и зависит от исходных условий их микроокружения. В экзокринной части органа, где изначально присутствуют M2 резидентные макрофаги [65, 97, 184], наблюдается активация дифференцировки предшественников ИСК протокового эпителия и пролиферация ИСК в агломератах. При этом количество островков сохраняется на уровне интактных животных, а в β -клетках островков увеличиваются размеры цитоплазмы за счет уменьшения ядра и повышается интенсивность их апоптоза на фоне сохранения общего количества β -клеток в сравнении с интактными животными.

Реакция ИСК на изменение их микроокружения зависит не только от исходных условий этого микроокружения, но также от функционального состояния самих клеток. Так, наиболее чувствительными к изменению условий своего микроокружения являются β -клетки островков II типа (со средним содержанием инсулина в β -клетках). Отмечается увеличение их доли от общего количества островков, в них увеличивается количество β -клеток за счет пролиферации, что приводит к компенсаторному повышению уровня апоптоза. При этом в островках I типа уменьшается количество пролиферирующих β -клеток, что способствует преобладанию апоптоза. В то же время островки с низким содержанием инсулина (III типа) являются

наиболее устойчивыми к изменению условий их микроокружения. Интенсивность процессов пролиферации и апоптоза их β -клеток соответствуют интактным животным.

При введении препарата аминодигидрофталазидиона натрия в условиях повреждения инсулин-синтезирующей системы в периферической крови нормализуется лейкоцитарная формула и уровень провоспалительных цитокинов.

В поджелудочной железе нормализуется общее количество клеток СФМ (у животных с повреждением инсулин-синтезирующей системы без введения препарата макрофагальная инфильтрация повышена) и значительно снижается концентрация продуцируемых ими провоспалительных цитокинов, обладающих цитотоксическим действием (INF γ , IL-1 α , IL-6), относительно 30-х суток наблюдения. Исключение составляет TNF α , его уровень независимо от введения препарата увеличивается. Кроме того, сохраняется высокое содержание IGF-1, основным источником которого в поджелудочной железе являются тканевые макрофаги [148]. Данный фактор роста индуцирует пролиферацию β -клеток и способствует их жизнеспособности [73].

Эти изменения функциональной активности панкреатических макрофагов в условиях повреждения содействуют сохранению общего количества инсулин-синтезирующих структур и оказывают на ИСК сходное влияние независимо от их локализации. Значительно уменьшается уровень апоптоза ИСК, нормализуется их распределение в паренхиме поджелудочной железы и повышается синтетическая активность. Кроме того, усиливается новообразование ИСК в результате активации их пролиферации в островках и дифференцировки / созревания клеток-предшественников в протоковом эпителии. Последнее проявляется повышенным содержанием одиночных ИСК с высокой синтетической активностью в протоковом эпителии. А увеличение числа агломератов ИСК (рассматриваемых в качестве начальной стадии образования островков [47]) и их клеточности может свидетельствовать о новообразовании панкреатических островков.

Вместе с этим выявляется неоднородная реакция на изменение условий микроокружения β -клеток островков, которая зависит от их синтетической активности. Так, на фоне общего снижения уровня апоптоза β -клеток в островках выявляется прямая зависимость его интенсивности от содержания инсулина в островках. В то же время пролиферативная активность β -клеток возрастает в панкреатических островках с высоким и низким уровнем флюоресценции инсулина, а в островках со средней синтетической активностью она сохраняется на уровне до введения препарата и соответствует интактным животным. В результате компенсация апоптоза β -клеток их пролиферацией наблюдается только в островках III типа, а в остальных – программируемая гибель клеток значительно преобладает. Несмотря на это, во всех типах островков наблюдается увеличение количества инсулиноцитов в 1,6 раза. Это может свидетельствовать о реализации других механизмов их новообразования, например, в результате трансдифференцировки из инсулин не синтезирующих клеток, например, α -клеток или ациноцитов [137] либо дифференцировки де-дифференцированных инсулиноцитов [155, 179].

Эти морфофункциональные изменения в инсулин-синтезирующей системе поджелудочной железы после иммуномодуляции способствуют повышению концентрации инсулина и снижению уровня гипергликемии в периферической крови. Улучшение доступности глюкозы для инсулинозависимых тканей организма приводит к нормализации морфологической структуры экзокринной части поджелудочной железы и повышению общей массы экспериментальных животных.

Полученные данные свидетельствуют, что модуляция функциональной активности макрофагов приводит к однотипной реакции тканевых макрофагов поджелудочной железы как в физиологических условиях, так и на фоне повреждения. Наблюдается неравномерное уменьшение количества макрофагов и смещение соотношения про-воспалительных цитокинов к противовоспалительным в сторону преобладания последних. Это

свидетельствует о стимуляции M2 и угнетении M1 функции макрофагов поджелудочной железы [109, 135, 146].

Влияние модуляции функциональной активности макрофагов на инсулин-синтезирующую систему в большей степени обусловлено изменением их функциональной активности, нежели изменением количества клеток. Об этом свидетельствует тот факт, что введение препарата АДФН как здоровым животным, так и крысам с патологией приводит к смещению соотношения провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в сторону преобладания последних. Снижение количества макрофагов в различных отделах органа является неравномерным. При этом независимо от условий (физиологические или патологические) наблюдается активация новообразования ИСК при любой степени изменения содержания макрофагов в их микроокружении.

Реакция инсулин-синтезирующей системы на изменение условий ее микроокружения проявляется в активации дифференцировки и созревании предшественников ИСК. Кроме того, прослеживается зависимость реакции β -клеток панкреатических островков от исходных условий иммуномодуляции. В физиологических условиях, когда иммуномодуляция приводит к снижению концентрации IL-1 α ниже физиологической нормы, отмечается повышение уровня апоптоза ИСК. В условиях патологии, когда введение препарата АДФН способствует снижению избыточного уровня провоспалительных цитокинов в их микроокружении, наблюдается снижение интенсивности апоптоза β -клеток и повышение их пролиферативной активности.

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют, что путем модуляции функциональной активности макрофагов как компонента микроокружения инсулин-синтезирующей системы можно оказывать влияние на ее морфофункциональные характеристики. В частности, можно добиться протекторного и стимулирующего репарацию эффекта в условиях повреждения, который проявляется в торможении процессов апоптоза и стимуляции образования ИСК независимо от локализации последних.

При этом необходимо отметить, что β -клетки островков с низким содержанием инсулина обладают наибольшим репаративным потенциалом. Это необходимо учитывать в случае заместительной терапии (трансплантации донорских ИСК).

Список статей, опубликованных по результатам 5 главы

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК РФ и/или индексируемых в МБД цитирования Scopus, WoS, PubMed:

1. Manifestation of the regenerative potential of beta cells of pancreatic islets during modulation of macrophage activity under conditions of experimental diabetes mellitus / K. Sokolova, I. Gette, I. Danilova, **T. Bulavintseva**, M. Abidov // *Virchows Archiv.* – 2018. – Vol. 473, Suppl 1. – P. S68-S69. doi: 10.1007/s00428-018-2493-z. (*Q1, IF Scopus – 6,8; WOS – Q2*).

2. Partial recovery from alloxan-induced diabetes by sodium phthalhydrazide in rats / I.G. Danilova, **T.S. Bulavintseva**, I.F. Gette, S.Y. Medvedeva, V.V. Emelyanov, M.T. Abidov // *Biomed. Pharmacother.* – 2017. – № 95. – P. 103-110. doi: 10.1016/j.biopha.2017.07.117. (*Q1, IF Scopus – 12,6; WOS – Q1; PubMed*).

3. **Булавинцева, Т.С.** Роль макрофагов в стимуляции пролиферативной активности β -клеток панкреатического островка в условиях экспериментального сахарного диабета. / Т.С. Булавинцева, И.Г. Данилова // *Вестник Уральской медицинской академической науки.* – 2014. – № 3. – С. 11-13. (*ИФ РИНЦ – 0,127*).

4. Гетте, И.Ф. Влияние модулирования активности макрофагов на содержание лейкоцитов периферической крови и костного мозга крыс с аллоксановым диабетом / И.Ф. Гетте, **Т.С. Булавинцева** // *Вестник Уральской медицинской академической науки.* – 2014. – № 3. – С. 19-20. (*ИФ РИНЦ – 0,127*)

5. Коррекция гистоморфометрических характеристик органов иммунопоза у крыс с аллоксановым диабетом посредством модуляции активности макрофагов / С.Ю. Медведева, **Т.С. Булавинцева**, И.Г. Данилова, И.Ф. Гетте, Б.Г. Юшков, С.В. Ломаева, М.Т. Абидов // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2013. – № 2. – С. 85-88. (ИФ РИНЦ – 0,115).

6. Модулирующее воздействие макрофагов на восстановление структурных изменений сосудистой оболочки глаза при экспериментальном сахарном диабете / И.Г. Данилова, С.Ю. Медведева, **Т.С. Булавинцева**, И.Ф. Гетте, С.Е. Смирных, М.В. Черешнева, М.Т. Абидов // Уральский медицинский журнал. – 2011. – № 01. – С. 49-53. (ИФ РИНЦ – 0,233).

7. Медведева, С.Ю. Влияние макрофагов на репаративную регенерацию островкового аппарата поджелудочной железы при аллоксановом диабете / С.Ю. Медведева, **Т.С. Булавинцева**, И.Г. Данилова // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2011. – № 2/1 (35). – С. 46-47. (ИФ РИНЦ – 0,225)

8. Влияние активации макрофагального звена иммунной системы на состояние селезенки и тимуса при аллоксановом диабете / **Т.С. Булавинцева**, С.Ю. Медведева, И.Ф. Гетте, М.Т. Абидов // Медицинская иммунология. – 2009. – Т. 11, № 4-5. – С. 305-306. (ИФ РИНЦ -0,376).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В гормональной регуляции углеводного обмена существует множество механизмов, повышающих уровень глюкозы в крови, и только инсулин способствует ее утилизации тканями. Этот факт определяет то, что продукция инсулина является наиболее уязвимым звеном к действию повреждающих факторов – Locus Minoris Resistantiae. Нарушение его продукции составляет основу целого спектра заболеваний, связанных как с недостаточностью гормона, так и с его избытком.

Так, известный с глубокой древности сахарный диабет, развивается в результате недостаточности действия инсулина на клетки-мишени. Эта недостаточность может быть следствием либо снижения его продукции или усиленного разрушения, что приводит к развитию сахарного диабета 1 типа, либо резистентности тканей к его действию на фоне нормальной или повышенной продукции, наблюдаемой при сахарном диабете 2 типа.

Избыточное действие инсулина на периферические ткани отмечается в условиях повышенной его секреции (инсулинома) или избыточного его введения извне (передозировка в случае заместительной терапии сахарного диабета или в случае терапии психических заболеваний). Хроническое повышение концентрации инсулина в крови может провоцировать развитие некоторых форм рака, в частности, рака молочной железы [13].

Физиологию и патологию продукции гормона чаще всего связывают с островками Лангерганса поджелудочной железы. Они представляют собой скопления эндокринных клеток, 67% которых занимают β -клетки, синтезирующие инсулин, оставшиеся 33% распределены между клетками, синтезирующими глюкагон, соматостатин, панкреатический полипептид и грелин [59]. Однако, помимо островков ИСК также локализуются в составе ацинарного и/или протокового эпителия в виде одиночных клеток или их

агломератов. Морфологически эти вне-островковые ИСК не отличаются от клеток ткани, в которой находятся [56, 171].

Наличие инсулина в клетках различных структур поджелудочной железы предполагает и единый биохимический процесс его образования в них.

Инсулин-синтезирующая система

Особый интерес представляет взаимодействие между инсулин-продуцирующими клетками различной локализации.

ИСК независимо от локализации происходят из общих клеток-предшественников первичных эпителиальных канальцев, развивающихся из зачатка кишечной энтодермы [10, 11, 170]. Как продемонстрировано многими исследователями в периоды эмбрионального развития и повышенной физиологической нагрузки (беременность, изменение рациона питания), увеличивается количество вне-островковые ИСК, что может быть предпосылкой для рассмотрения их в качестве источника репарации и восстановления общего количества ИСК [111, 123, 132, 195]. При этом все они, секретирруя инсулин, осуществляют регуляцию обмена веществ и пищеварения. Панкреатические островки регулируют обмен веществ организма в целом, секретирруя свои гормоны главным образом в общий кровоток [29, 30, 43]. А вне-островковые ИСК, секретирруя инсулин в межклеточное пространство и систему выводных протоков экзокринной секреции [59, 89, 94], участвуют в локальной регуляции обмена веществ и функции эпителия стенки кишечника [43, 48, 94]. Более того, ацино-инсулярные клетки, выделяя свои зимогенные гранулы в кровоток, участвуют в созревании, модификации [29, 30] и деградации [41] циркулирующих гормонов (в частности инсулина) и ростовых факторов.

Тот факт, что признается общее происхождение ИСК различной локализации и они выполняют одну функцию, является аргументом, позволяющим рассматривать их в качестве единой системы [1].

Ключевая проблема любой системы организма – это надежность ее функционирования в физиологических и патологических условиях, а также при изменении среды и действии экстремальных факторов.

Исходя из этого применительно к инсулин-продуцирующей системе были сформулированы ключевые критерии надежности продукции инсулина, которая сводится к следующим положениям:

1. Различные структуры должны отличаться по функциональной активности инсулиноцитов.

2. Инсулин-продуцирующие клетки и их структуры должны отличаться по своей чувствительности к действию повреждающих и экстремальных факторов.

3. Инсулин-продуцирующие клетки и их структуры должны отличаться по своей способности к репарации.

4. В структурах системы должны существовать механизмы, осуществляющие регуляцию функции и регенерации инсулин-продуцирующих клеток.

Проверке этих положений и было посвящено исследование.

Морфофункциональная неоднородность инсулин-синтезирующих структур и их клеток

При сравнении ИСК различных структур оказалось, что в физиологических условиях они различаются своей морфологией, синтетической активностью, а также интенсивностью процессов пролиферации и апоптоза. Сами структуры содержат разное количество ИСК.

Большую часть от общего количества инсулин-синтезирующих структур составляют панкреатические островки (61%), которые осуществляют регуляцию углеводного обмена путем секреции гормонов в общий кровоток [30]. В большинстве исследований панкреатические островки Лангерганса были определены как структуры поджелудочной железы, имеющие диаметр 100-200 мкм, окруженные неполной капсулой из фибробластов и двойной базальной мембраны, с более высокой васкуляризацией и включающие

клетки, содержащие инсулин, соматостатин, глюкагон и полипептиды [56]. Форма инсулин-синтезирующих β -клеток островка чаще всего вытянутая, их овальное ядро смещено к апикальному полюсу клетки. Секреторные гранулы сконцентрированы на базальной ее части, обращенной к капилляру, и содержат главным образом инсулин и проинсулин [9]. В сравнении с вне-островковыми ИСК β -клетки островков характеризуются наибольшим уровнем пролиферации и апоптоза.

Внеостровковые ИСК равномерно распределены по всей паренхиме органа и представлены одиночными клетками, локализованными в составе ацинарного и протокового эпителия, и их агломератами диаметром менее 20 мкм (до 5-ти клеток), не имеющих капсулу в отличие от панкреатических островков [56].

Одиночные ацино-инсулярные клетки имеют коническую форму с ядром, смещенным к базальному полюсу клетки. Они содержат в цитоплазме одновременно с зимогеном инкреторные гранулы с инсулином [29, 30], равномерно распределенные в клетке. При этом в сравнении с другими ИСК инсулиноциты ацинусов характеризуются наибольшим содержанием инсулина и размером цитоплазмы, а также наименьшим уровнем апоптоза.

Одиночные ИСК протоков имеют вытянутую форму, с центрально расположенным ядром, гранулы инсулина чаще всего сконцентрированы на одном полюсе. Эти клетки имеют наименьшую частоту встречаемости среди других ИСК паренхимы, при этом они обладают низкой интенсивностью апоптоза и сопоставимыми с β -клетками размерами и содержанием инсулина.

Большая часть вне-островковых ИСК собрана в агломераты (до 5 клеток), которые в отличие от островков не содержат в своем составе глюкагон-, соматостатин- или полипептид-иммунореактивные клетки [56]. При этом их клетки имеют морфологию эпителия, в котором локализованы (т.е. ацинарных и/или протоковых клеток).

Несмотря на наличие апоптотирующих ИСК, локализованных вне островков, среди них не выявляются пролиферирующие клетки (Ki-

67⁺инсулин⁺). Это свидетельствует о том, что их обновление зависит от пролиферации клеток-предшественников, не содержащих инсулин, которые затем дифференцируются в ИСК, или от транс-дифференцировки ациноцитов / эпителиальных клеток. Это предположение подтверждается данными литературы [170].

Неоднородность морфофункциональных характеристик клеток, синтезирующих инсулин, прослеживается не только в различных структурах, но и в пределах одной (отдельной) структуры. Согласно полученным данным панкреатические островки различаются базальным содержанием инсулина и соотношением процессов пролиферации и апоптоза их β -клеток. При этом выявляется прямая взаимосвязь между содержанием инсулина в островках и пролиферативной активностью их β -клеток. β -клетки островков с высоким содержанием инсулина характеризуются наибольшим уровнем самообновления (максимальный уровень пролиферации и апоптоза), что связано с повышенной функциональной активностью. Островки со средним содержанием инсулина обладают наименьшей интенсивностью апоптоза β -клеток. По данным литературы островки с низким содержанием инсулина обладают низкой плотностью капилляров и находятся в гипоксических условиях, они рассматриваются в качестве «спящей» субпопуляции островков, которая может в условиях возрастания метаболической потребности насыщаться кислородом и активировать свою функциональную активность [40]. Однако нами были получены данные, что в физиологических условиях в этих островках интенсивность апоптоза β -клеток значительно преобладает над их пролиферацией, что может свидетельствовать о некоторой инволюции этих островков.

Таким образом, в физиологических условиях ИСК, а значит и структуры, которые они образуют, имеют различную синтетическую активность, равно как и соотношение процессов пролиферации и апоптоза. Исходя из этого можно предположить, что они будут также обладать различной чувствительностью к действию повреждающих факторов.

Инсулин-продуцирующие структуры и их клетки различаются по своей чувствительности к повреждению

Для проверки данного предположения был использован химический диабетоген аллоксан (2,4,5,6-тетраоксипиримидин; 5,6-диоксиурацил), который является структурным аналогом глюкозы, что обеспечивает его избирательное связывание с транспортером глюкозы (GLUT-2) ИСК и специфическое токсическое действие на них [129]. Механизм повреждения одинаков для всех ИСК независимо от их локализации, поскольку все они имеют на своей поверхности GLUT-2 [47]. Проникая внутрь клетки, аллоксан повреждает цитоплазматическую и внутриклеточные мембраны, а также глюкокиназу и рецепторы GLUT-2 [129]. Известно, что токсическое действие аллоксана длится в течении нескольких минут [130], но вызванные им изменения в β -клетках необратимы. Кроме того, он выступает в качестве триггера образования ряда эндогенных факторов, повреждающих инсулин-синтезирующую систему в течение длительного времени (в данном исследовании рассмотрен период до 60 суток). В качестве таких повреждающих факторов можно привести гипергликемию, а также развитие выраженного воспаления в паренхиме поджелудочной железы. Последнее проявляется в инфильтрации органа макрофагами и повышении уровня провоспалительных цитокинов, обладающих выраженным цитотоксическим действием (INF- γ , IL-1 α , IL-6).

Полученные результаты исследования свидетельствуют, что наибольший уровень повреждения выявляется в панкреатических островках, β -клетки которых на начальной стадии (30-е сутки наблюдения) снижают свою синтетическую функцию. Затем на более поздних сроках (к 60-м суткам) наблюдается массовая гибель ИСК, приводящая к снижению количества островков. При этом островки с высоким содержанием инсулина в их β -клетках наиболее сильно страдают от действия повреждающих факторов, уровень апоптоза их β -клеток в 4 раза превышает уровень в других типах островков. К тому же в этих островках не выявляются пролиферирующие

инсулиноциты. Интенсивность апоптоза β -клеток напрямую зависит от содержания инсулина и плотности β -клеток в островках. Это свидетельствует, о том, что включение «программы смерти» в β -клетках в числе прочего происходит в результате их функционального перенапряжения.

Более интенсивная деструкция островковых ИСК в сравнении с вне-островковыми может быть связана с одной стороны с большей плотностью капилляров островков в сравнении с экзокринной частью [91], что способствует более сильному воздействию повреждающих факторов. С другой стороны, повреждение ИСК приводит к нарушениям архитектоники островка, паракринных взаимодействий между его клетками [161] и снижению пролиферации β -клеток [84].

Внеостровковые ИСК являются более устойчивыми к действию повреждающих факторов. ИСК агломератов характеризуются низкой чувствительностью к действию повреждающих факторов, поскольку их количество, уровень апоптоза и синтетической активности клеток значительно не меняются относительно интактных животных на протяжении всего срока наблюдения. Устойчивость же одиночных ИСК связана с высокой интенсивностью их новообразования (дифференцировки и транс-дифференцировки).

Инсулин-продуцирующие структуры и их клетки различаются репаративным потенциалом

Наряду с различной чувствительностью к повреждению инсулин-синтезирующие структуры также характеризуются различным потенциалом к репарации. В условиях действия повреждающих факторов наибольшая интенсивность репарации наблюдается среди одиночных ИСК. При этом активация дифференцировки предшественников ИСК в протоках значительно превосходит уровень деструкции последних и приводит к росту количества данного типа клеток. А интенсивность транс-дифференцировки ацинарных клеток в инсулин-синтезирующие полностью компенсирует уровень апоптоза инсулоаиноцитов.

В агломератах, напротив, активация репаративных процессов на данных сроках наблюдения (30-е и 60-е сутки) отсутствует, поскольку их клеточность снижается, а пролиферативная и синтетическая активность не меняются на фоне повреждения.

В островках прослеживается реализация двух различных механизмов развития компенсаторно-приспособительных процессов. В первой группе островков на фоне сниженного содержания инсулина в β -клетках наблюдается активация их пролиферации. Исследование их структуры свидетельствует, что активация пролиферации связана с низкой плотностью их β -клеток. Во второй группе, наоборот наблюдается стимуляция синтетической функции за счет подавления пролиферации. Это связано с сохранением наибольшей их плотности, что обеспечивает лучшую коммуникацию и функцию сохранившихся ИСК [59].

Роль макрофагов микроокружения инсулин-синтезирующих клеток в регуляции секреторной функции инсулиноцитов, их повреждении и регенерации

Полученные результаты исследования дают основание предположить, что морфофункциональная неоднородность инсулин-синтезирующих структур связана с особенностями их микроокружения. Одним из ключевых его компонентов являются резидентные макрофаги. Они принимают активное участие в регуляции эмбрионального развития, синтетической активности ИСК и поддержания тканевого гомеостаза [38, 64, 77], поскольку они способны воспринимать метаболические и эндокринные сигналы, экспрессируя на своей поверхности значительное количество нейроэндокринных рецепторов [116].

В физиологических условиях макрофаги панкреатических островков характеризуются про-воспалительным M1 профилем активации [77] и составляют около 2% от общего их количества в органе. Наибольшее количество тканевых макрофагов поджелудочной железы представлено

альтернативно активированными M2 макрофагами [73, 88, 138], локализованными в экзокринной части органа.

При этом β -клетки сами стимулируют M1 поляризацию островковых макрофагов, секретировав большое количество инсулина в межклеточное пространство [163].

Клетки СФМ одними из первых реагируют на повреждение инсулин-синтезирующей системы и сами могут выступать в качестве повреждающего ИСК фактора. В ответ на повышение медиаторов, образующихся в результате гибели ИСК (некроз и апоптоз) [129], и белков стресса (S100A8 и IL-1) [105, 142] моноциты / макрофаги мигрируют в зону с наибольшей степенью деструкции ИСК (островки и ацинарная часть). При этом инфильтрирующие моноциты/макрофаги характеризуются M1 профилем активации [75], что может быть обусловлено действием гипергликемии [125] и проявляется повышением концентрации про-воспалительных цитокинов (IL-1 α , IL-6, INF- γ и TNF- α) в строме. Активные радикалы (NO \bullet и O $_2\bullet$) и про-воспалительные цитокины сами обладают выраженным цитотоксическим действием [125, 137] и способны угнетать синтез и секрецию инсулина [106, 177].

Наряду с этим, тканевые макрофаги принимают активное участие в очищении ткани от поврежденных и мертвых клеток, а также способны оказывать регуляторное влияние на ее репарацию [73]. Последнее реализуется через секрецию противовоспалительных (IL-10, TGF- β), про-воспалительных (TNF, IL-6) цитокинов и глюкокортикоидов, которые способствуют привлечению регуляторных T-клеток и развитию Th2 иммунного ответа [60, 75, 190, 192]. Кроме того, продуцируя различные факторы роста, они могут также способствовать ангиогенезу (TNF, VEGF) [38], пролиферации β -клеток (IGF-1, IL-10, TGF- β) [76, 118] и повышению их жизнеспособности в условиях патологии [73].

Исходя из этого, можно предположить, что модуляция спектра функциональной активности клеток СФМ может повлиять на синтез инсулина

в ИСК, их пролиферацию и интенсивность апоптоза как в физиологических, так и в патологических условиях.

В качестве фармакологического иммуномодулятора был выбран препарат на основе аминодигидрофталазида натрия (АДФН), обладающего выраженной противовоспалительной активностью [1, 100, 114, 180], основной точкой приложения которой считаются клетки моноцитарно-макрофагального ряда [100, 176]. Механизм действия данного препарата связан, с одной стороны, с угнетением секреции про-воспалительных цитокинов (INF- γ , TNF- α , IL-6) и активных форм радикалов [1, 100, 114, 180], а с другой – с повышением продукции противовоспалительных факторов (IL-10, VEGF) [19, 140] активированными клетками СФМ.

Модуляция функциональной активности панкреатических макрофагов у здоровых крыс способствует неравномерному снижению их количества в островках. Наибольшая степень снижения наблюдается в островках с высоким содержанием инсулина. В экзокринной части органа количество макрофагов сохраняется нормальным.

По нашим данным под влиянием препарата снижается синтез IL-1 α (индикатор M1) и повышается секреция IL-10 (индикатор M2), что свидетельствует о его влиянии на поляризацию функциональной активности макрофагов в направлении активации M2 [109, 146].

Стимуляция функции M2 резидентных макрофагов экзокринной части органа способствует активации дифференцировки / созревания предшественников ИСК в протоковом эпителии и новообразованию панкреатических островков. А угнетение M1 макрофагов панкреатических островков приводит к повышению уровня апоптоза β -клеток.

Вместе с этим реакция инсулин-синтезирующих структур на изменение условий их микроокружения зависит также от функциональной активности их ИСК и проявляется в разнонаправленном изменении морфофункциональных параметров β -клеток островков с различной синтетической активностью. Снижение уровня IL-1 α в микроокружении β -клеток островков с высоким

содержанием инсулина приводит к снижению их функциональной и пролиферативной активности, в то время как в островках со средним содержанием инсулина – к повышению пролиферации. При этом прослеживается прямая зависимость уровня их апоптоза и обратная зависимость уровня пролиферации β -клеток от их синтетической активности.

Повышение концентрации про-воспалительных цитотоксических цитокинов (IL-1 α , IL-6, INF γ), секретируемых инфильтрирующими M1 макрофагами в условиях патологии (повреждения ИСК), приводит к снижению синтетической активности и апоптозу β -клеток. Вместе с этим известно, что M2 резидентные макрофаги экзокринной части органа не меняют свою функциональную поляризацию в условиях гипергликемии, в отличие от циркулирующих моноцитов и макрофагов моноцитарного происхождения [64]. Вместо этого гипергликемия способствует их пролиферации [134]. Это косвенно подтверждается повышением количества макрофагов в экзокринной части поджелудочной железы и концентрации противовоспалительных цитокинов (IL-10 и IGF-1) в органе, способных стимулировать новообразование внеостровковых ИСК, что мы и наблюдали.

Угнетение секреции про-воспалительных цитокинов, с выраженным цитотоксическим действием (INF- γ , IL-1 α , IL-6) гипер-активированными макрофагами в условиях патологии, снижает уровень апоптоза ИСК, а также увеличивает общее количество ИСК в результате активации их пролиферации в панкреатических островках и новообразования внеостровковых ИСК и их агрегатов. При этом, наибольшая активация пролиферации β -клеток наблюдается в островках с низким содержанием инсулина.

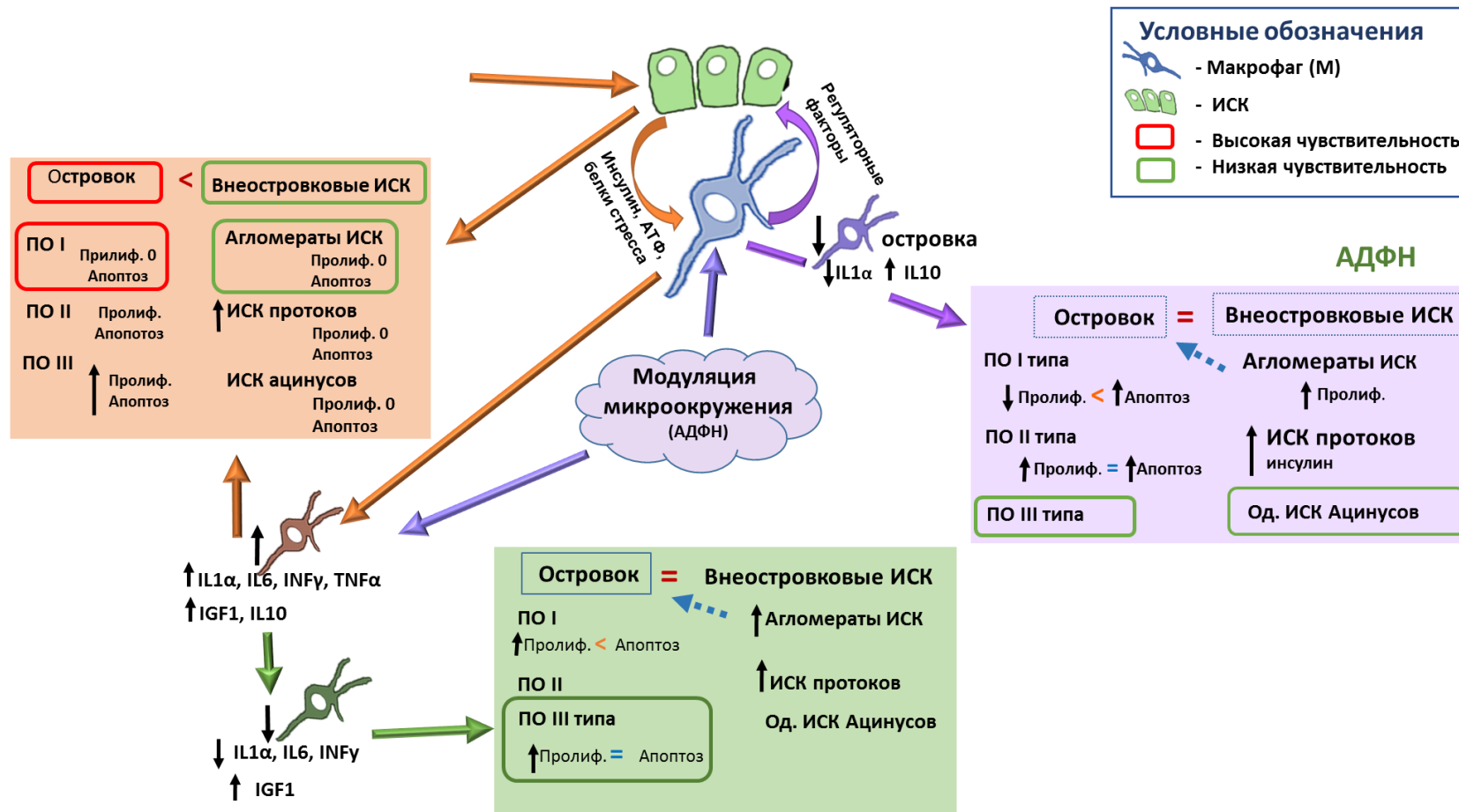


Рисунок 23 – Схема взаимного влияния инсулин-синтезирующих клеток (ИСК) и их микроокружения

Примечание: АДФН – аминоксигидрофталазид натрия, Пролиф. – пролиферация (Ki-67), ПО – панкреатический островок, ПО I типа – панкреатический островок с высоким содержанием инсулина в его β-клетках, ПО II типа – панкреатический островок со средним содержанием инсулина в его β-клетках, ПО III типа – панкреатический островок с низким содержанием инсулина в его β-клетках, ИСК – инсулин-синтезирующие клетки, Од. ИСК – одиночные инсулинсинтезирующие клетки.

Таким образом, ИСК поджелудочной железы характеризуются выраженной гетерогенностью своей морфологии, синтетической, пролиферативной и апоптотической активности, а также чувствительности к повреждению в зависимости от своей локализации и функциональной активности. Наиболее чувствительными к действию повреждения являются β -клетки панкреатических островков I типа, в то время как ИСК агломератов резистентны, а одиночные клетки обладают высокой скоростью восстановления в данных условиях.

Повреждение ИСК оказывает значительное влияние на их микроокружение, также, как и модуляция микроокружения с помощью препарата аминодигидрофталазиндиона натрия (противовоспалительное, антиоксидантное действие) на морфофункциональные характеристики ИСК. При этом ИСК островков III типа и ацинарного эпителия – наиболее устойчивы к данным условиям. В островках I типа наблюдается разнонаправленное изменение уровня пролиферации и апоптоза β -клеток, а в островках II типа – синхронное их увеличение. В экзокринной части растет пролиферация ИСК агломератов, число ИСК протоков и содержание инсулина в них.

Введение препарата на фоне повреждения ИСК способствует снижению количества макрофагов, про-воспалительных цитокинов и уровня апоптоза ИСК, а также увеличению количества ИСК и их синтетической функции вне зависимости от локализации. При этом наибольшая активация пролиферации ИСК наблюдается в островках III типа (*рисунок 23*).

ВЫВОДЫ

1. В физиологических условиях инсулин-синтезирующие клетки, представленные β -клетками панкреатических островков, одиночными клетками экзокринного эпителия и их агрегатами, значительно различаются по своим морфофункциональным характеристикам, а также по соотношению пролиферации и апоптоза в зависимости от своей локализации в паренхиме поджелудочной железы.

2. Модуляция секреторной активности макрофагов с помощью препарата аминодигидрофталазидиона натрия у здоровых животных приводит к разнонаправленному изменению соотношения процессов образования и апоптоза инсулин-синтезирующих клеток в зависимости от локализации в паренхиме поджелудочной железы.

3. В условиях патологии, вызванной введением аллоксана, наибольшей чувствительностью к повреждению обладают инсулин-синтезирующие клетки панкреатических островков с высоким содержанием инсулина, агрегаты наиболее резистентны, а одиночные инсулин-синтезирующие клетки реагируют на него увеличением количества.

4. Компенсаторно-приспособительные реакции на повреждение инсулин-синтезирующих клеток представлены гиперплазией (пролиферация и дифференцировка клеток-предшественников в протоковом эпителии) и гипертрофией клеток на фоне отсутствия их пролиферации; первая преимущественно характерна для β -клеток островков с низким содержанием инсулина и одиночных инсулин-синтезирующих клеток протокового эпителия, а вторая – для β -клеток островков с высоким содержанием инсулина.

5. Модуляция секреторной активности макрофагов с помощью препарата аминодигидрофталазидиона натрия в условиях повреждения инсулин-синтезирующих клеток способствует снижению макрофагальной

инфильтрации и концентрации цитотоксических провоспалительных цитокинов в поджелудочной железе, что, в свою очередь, приводит к снижению уровня апоптоза инсулиноцитов, повышению их количества и синтетической активности.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Модуляторы функциональной активности макрофагов, например, аминодигидрофталазиндион натрия, могут быть использованы в качестве перспективных средств при разработке новых способов фармакологической терапии нарушений углеводного обмена.

2. В ходе трансплантационной терапии необходимо учитывать присущую инсулин-синтезирующим структурам гетерогенность морфофункциональных характеристик, устойчивости к повреждению и репаративного потенциала.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность специалистам, чей вклад способствовал работе над диссертацией: руководителю лаборатории морфологии и биохимии доктору биологических наук И.Г. Даниловой, совместно с которой осуществлялось планирование эксперимента и анализ полученных результатов, доктору медицинских наук, профессору М.Т. Абидову, предоставившему аминокислоты для проведения этого исследования, и старшему научному сотруднику ИИФ УрО РАН, кандидату биологических наук И.Ф. Гетте, совместно с которой осуществлялось моделирование повреждения ИСК и определение биохимических показателей крови экспериментальных животных.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДФН –	аминодигидрофталазид натрия
АТФ –	аденозинтрифосфат
ДНК –	дезоксирибонуклеиновая кислота
ИСК –	инсулин-синтезирующие клетки
ИФА –	иммуноферментный анализ
отн.ед. –	относительные единицы
ПО –	панкреатический островок
СФМ –	система фагоцитирующих моноклеаров
IGF-1 (insulin-like growth factor 1)	инсулино-подобный фактор роста-1
IL (interleukin) –	интерлейкин
INF γ (interferon gamma) –	интерферон гамма
N/мм ² –	штук в 1 мм ²
PBS (phosphate-buffered saline) –	фосфатно-солевой буфер
TNF α (tumor necrosis factor alpha)	фактор некроза опухоли
TUNEL (terminal deoxynucleotidyl)	маркировка концевых участков dUTP терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазы

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абидов, М.Т. Иммунотропная активность тамерита / М.Т. Абидов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2000. – Прил. 3. – С. 11-19.
2. Анохин, П.К. Очерки по физиологии функциональных систем / П.К. Анохин. – Москва: Медицина, 1975. – 448 с.
3. Балаболкин, М.И. Лечение сахарного диабета и его осложнений (руководство для врачей) / М.И. Балаболкин, Е.М. Клебанова, В.М. Креминская. – Москва: Медицина, 2005. – 512 с.
4. Балаболкин, М.И. Эндокринология / М.И. Балаболкин. – Москва: Универсум паблишинг, 1998. – 416 с.
5. Бочкарева Л.А. Некоторые механизмы развития воспаления при сахарном диабете 2 типа / Л.А. Бочкарева, Л.В. Недосугова, Н.А. Петунина, и др. // Сахарный диабет. 2021. – Т. 24, № 4. – С. 334-341. <https://doi.org/10.14341/DM12746>.
6. Всемирная организация здравоохранения: [электр. ресурс] // https://gateway.euro.who.int/ru/indicators/hfa_379-2370-prevalence-of-diabetes-mellitus/ (дата обращения 3.09.2023).
7. Гузев, К.С. Фармация древнего Египта / К.С. Гузев // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2017. – Т 17, № 3. - С. 184-189.
8. Данилова, И.Г. Способ моделирования аллоксанового диабета патент RU 2534411 С1, рег. 04.06.2013 / Данилова И.Г., Гетте И.Ф., Булавинцева Т.С.; Институт иммунологии и физиологии УрО РАН // Бюлл. - 2014. - № 11.
9. Данилова, Р.К. Руководство по гистологии / под ред. Р.К. Данилова. – 2-е изд., испр. и доп. – Санкт-Петербург: СпецЛит, 2011. – Т. 2. – 511с.

10. Диетерлен-Лиевр, Ф. Иммуноцитологическое исследование онтогенеза эндокринной части поджелудочной железы у куринных эмбрионов: нормальное развитие и панкреатические потенции спланхоплевры ранних стадий развития // Эволюционная эндокринология поджелудочной железы / Ф. Диетерлен-Лиевр, Д.Бопен. – Ленинград. - 1977. – С. 56-15.

11. Казакова, И.А. Механизмы влияния макрофагов на репаративную регенерацию (экспериментальное исследование): автореф. дис. на соиск. учен. степ. канд. биол. наук (03.00.01) / Казакова Ирина Александровна. – Екатеринбург, 2014. – 25 с.

12. Кобылянский, В.И. Роль контринсулярных гормонов в регуляции гомеостаза глюкозы и патогенеза сахарного диабета 2-го типа при ХОБЛ / В.И. Кобылянский // Проблемы эндокринологии. – 2021. – Т. 67, № 2. – С. 93-101. doi: 10.14341/probl12566.

13. Манушарова, Р.А. Инсулинома (клиника, диагностика и лечение) / Р.А. Манушарова, Д.И. Черкезов // Медицинский совет. – 2011. – № 1-2. – С. 59-63. – EDN NEAGXN.

14. Медведева С.Ю. Токсическое действие аллоксана в динамике развития аллоксанового диабета / С.Ю. Медведева, Т.С. Булавинцева, И.Г. Данилова, И.Ф. Гетте, В.Г. Сенцов // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2012. - № 3. –с.30-33.

15. Можейко, Л.А. Экспериментальные модели для изучения сахарного диабета часть I. Аллоксановый диабет / Л.А. Можейко // Журнал ГрГМУ. – 2013. – № 3. – С. 26.

16. Поздина, В.А. Иммунофенотипические особенности макрофагов печени и перитонеальной области животных с моделью сахарного диабета 1 типа и их коррекция аминодигидрофталазиндионом натрия *in vitro* / В.А. Поздина, И.Г. Данилова, М.Т. Абидов // Цитология. – 2020. – Т. 62, № 8. – С. 581-590. doi: 10.31857/S0041377120080064.

17. Ранцев, М.А. Новый подход к лечению распространённого панкреонекроза в эксперименте / М.А. Ранцев, П.А. Сарапульцев,

О.Н. Чупахин, [и др.] // Пермский медицинский журнал. – 2013. – Т. 30, № 5. – С. 116-119.

18. Севергина, Э.С. Инсулинозависимый сахарный диабет – взгляд морфолога / Э.С. Севергина. – Москва: Издат. дом Видар-М, 2002. –152 с.

19. Селятитская, В.Г. Глюкокортикоидные гормоны: от процессов адаптации к экологическим факторам севера до метаболических нарушений при диабете / В.Г. Селятитская // Бюллетень СО РАМН. – 2012. – Т. 32, № 1. – С. 13-20.

20. Семченко, В.В. Гистологическая техника: учебное пособие / В.В. Семченко, С.А. Барашкова, В.Н. Ноздрин, [и др.] – 3-е изд., доп. и перераб. – Омск: Омская медицинская академия, 2006. – 279 с.

21. Симбирцев, А.С. Цитокины в лабораторной диагностике / А.С. Симбирцев, А.А. Тотолян // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. – 2015. – № 2. – С. 82-98.

22. Федеральный регистр больных сахарным диабетом: [электр. ресурс] // <https://sd.diaregistry.ru/content/o-proekte.html> (дата обращения 1.09.2023).

23. Физиология эндокринной системы / под ред. Дж. Гриффина, С. Охеды; пер. с англ. – Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. – 496 с.

24. Фролов, Ю.П. Современные методы биохимии / Ю.П. Фролов. – Самара: Изд-во «Самарский университет», 2003. – 412 с.

25. Цибулевский А.Ю. Биологические системы в современной естественнонаучной картине мира: ч. I / А.Ю. Цибулевский // Успехи современного естествознания. – 2008. - №4. – С. 17-21.

26. Черешнев, В.А. Изменение функциональных показателей повреждения печени при экспериментальном токсическом гепатите и способ их коррекции / В.А. Черешнев, З.А. Шафигуллина, С.Ю. Медведева, [и др.] // Российский иммунологический журнал. – 2018. – Т. 12 (21), № 4. – С. 785-787.

27. Шестакова, М.В. Экзокринная недостаточность поджелудочной железы при сахарном диабете 1 и 2 типа. / М.В. Шестакова, И.В. Маев,

А.С. Аметов, М.Б. Анциферов, и др. // Сахарный диабет. – 2023. – Т. 26, № 2. С. 215-225. <https://doi.org/10.14341/DM13027>.

28. Юшков, Б.Г. Понятие нормы в физиологии (физиологические константы лабораторных животных) / Б.Г. Юшков, В.А. Черешнев. – Москва: Центр стратегического партнерства, 2016. – 616 с.

29. Яглов, В.В. Актуальные проблемы биологии ациноостровковых клеток поджелудочной железы / В.В. Яглов, Н.В. Яглова // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2010. – № 7. – С. 28.

30. Яглов, В.В. Морфология и классификация ацино-островковых клеток поджелудочной железы / В.В. Яглов, Ю.К. Елецкий // Архив анат. – 1975. – Т. 69, № 12. – С. 20-23.

31. Aamodt, K.I. Signals in the pancreatic islet microenvironment influence β -cell proliferation / K.I. Aamodt, A.C. Powers // Diabetes Obes. Metab. – 2017. – Suppl 1. – P. 124-136. doi: 10.1111/dom.13031.

32. Abidov, M.T. Accelerated generation of extra-islet insulin-producing cells in diabetic rats, treated with sodium phthalhydrazide / M.T. Abidov, K.V. Sokolova, I.F. Gette, [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2022. – Vol. 23, № 8. – P. 4286. doi: 10.3390/ijms23084286.

33. Aguayo-Mazzucato, C. β cell aging markers have heterogeneous distribution and are induced by insulin resistance / C. Aguayo-Mazzucato, M. van Haaren, M. Mruk M, [et al.] // Cell Metab. – 2017. – Vol. 25, № 4. – P. 898-910. doi: 10.1016/j.cmet.2017.03.015.

34. Aida, K. Crucial role of Reg I from acinar-like cell cluster touching with islets (ATLANTIS) on mitogenesis of beta cells in EMC virus-induced diabetic mice / K. Aida, T. Kobayashi, A. Takeshita, [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2018. – Vol. 503, № 2. – P. 963-969. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.06.103.

35. Aida, K. Distinct cell clusters touching islet cells induce islet cell replication in association with over-expression of Regenerating Gene (REG) protein in fulminant type 1 diabetes / K. Aida, S. Saitoh, Y. Nishida, [et al.] // PLoS One. – 2014. – Vol. 9, № 4. – P. e95110. doi: 10.1371/journal.pone.0095110.

36. Ali, M.K. Interpreting global trends in type 2 diabetes complications and mortality / Ali MK, Pearson-Stuttard J, Selvin E, [et al.] // *Diabetologia*. – 2022. – Vol. 65, № 1. – P. 3-13. doi:10.1007/s00125-021-05585-2
37. Almaça, J. Young capillary vessels rejuvenate aged pancreatic islets / J. Almaça, J. Molina, R.A.E. Arrojo, [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2014. – Vol. 111, № 49. – P. 17612-17617. doi: 10.1073/pnas.1414053111.
38. Arango Duque, G. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases / G. Arango Duque, A. Descoteaux // *Front. Immunol.* – 2014. – Vol. 5. – P. 491. doi: 10.3389/fimmu.2014.00491.
39. Atanes, P. C3aR and C5aR1 act as key regulators of human and mouse β -cell function / P. Atanes, I. Ruz-Maldonado, A. Pingitore, [et al.] // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2018. – Vol. 75, № 4. – P. 715-726. doi: 10.1007/s00018-017-2655-1.
40. Aughsteen, A.A. Morphometric studies on the juxta-insular and tele-insular acinar cells of the pancreas in normal and streptozotocin-induced diabetic rats / A.A. Aughsteen, K. Kataoka // *J. Electron. Microsc. (Tokyo)*. – 1993. – Vol. 42, № 2. – P. 79-87.
41. Avrahami D. Beta cell heterogeneity: an evolving concept. / D. Avrahami, A Klochender, Y Dor, B Glaser // *Diabetologia*. – 2017. – Vol. 60, № 8. – P. 363-1369. doi: 10.1007/s00125-017-4326-z.
42. Baeyens, L. Cellular plasticity of the pancreas / L. Baeyens, L. Bouwens // *Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 390, №10. – P. 995-1001. doi: 10.1515/BC.2009.117.
43. Baeyens, L. In vitro generation of insulin-producing beta cells from adult exocrine pancreatic cells / L. Baeyens, S. De Breuck, J. Lardon, [et al.] // *Diabetologia*. – 2005. – Vol. 48, № 1. – P. 49-57. doi: 10.1007/s00125-004-1606-1.
44. Ballian, N. Islet vasculature as a regulator of endocrine pancreas function / N. Ballian, F.C. Brunicardi // *World J. Surg.* – 2007. – Vol. 31, № 4. – P. 705-714. doi: 10.1007/s00268-006-0719-8.
45. Barreto, S.G. The islet-acinar axis of the pancreas: more than just insulin / S.G. Barreto, C.J. Carati, J. Toouli, [et al.] // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2010. – Vol. 299, № 1. – P. G10-G22. doi: 10.1152/ajpgi.00077.2010.

46. Beamish, C.A. Decrease in Ins⁺Glut2^{LO} β -cells with advancing age in mouse and human pancreas / C.A. Beamish, S. Mehta, B.J. Strutt, [et al.] // *J. Endocrinol.* – 2017. – Vol. 233, № 3. – P. 229-241. doi: 10.1530/JOE-16-0475.

47. Beamish, C.A. Insulin-positive, Glut2-low cells present within mouse pancreas exhibit lineage plasticity and are enriched within extra-islet endocrine cell clusters / C.A. Beamish, B.J. Strutt, E.J. Arany, [et al.] // *Islets.* – 2016. – Vol. 8, № 3. – P. 65-82. doi: 10.1080/19382014.2016.1162367.

48. Beer, R.L. Centroacinar cells: At the center of pancreas regeneration / R.L. Beer, M.J. Parsons, M. Rovira // *Dev. Biol.* – 2016. – Vol. 413, № 1. – P. 8-15. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.02.027.

49. Bendayan, M. Contacts between endocrine and exocrine cells in the pancreas / M. Bendayan // *Cell Tissue Res.* – 1982. – Vol. 222, № 1. – P. 227-230. doi: 10.1007/BF00218303.

50. Benner, C. The transcriptional landscape of mouse beta cells compared to human beta cells reveals notable species differences in long non-coding RNA and protein-coding gene expression / C. Benner, T. van der Meulen, E. Cacères, [et al.] // *BMC Genomics.* – 2014. – Vol. 15, № 1. – P. 620. doi: 10.1186/1471-2164-15-620.

51. Bertelli, E. Association between islets of Langerhans and pancreatic ductal system in adult rat. Where endocrine and exocrine meet together? / E. Bertelli, M. Regoli, D. Orazioli, [et al.] // *Diabetologia.* – 2001. – Vol. 44. – P. 575. doi: 10.1007/s001250051663.

52. Böni-Schnetzler, M. β cell-specific deletion of the IL-1 receptor antagonist impairs β cell proliferation and insulin secretion / M. Böni-Schnetzler, S.P. Häuselmann, E. Dalmas, [et al.] // *Cell Rep.* – 2018. – Vol. 22, № 7. – P. 1774-1786. doi: 10.1016/j.celrep.2018.01.063.

53. Bonner-Weir, S. Islet neogenesis: a possible pathway for beta-cell replenishment / S. Bonner-Weir, L. Guo, W.C. Li, [et al.] // *Rev. Diabet. Stud.* – 2012. – Vol. 9, № 4. – P. 407-416. doi: 10.1900/RDS.2012.9.407.

54. Bonner-Weir, S. Transdifferentiation of pancreatic ductal cells to endocrine beta-cells / S. Bonner-Weir, A. Inada, S. Yatoh, [et al.] // *Biochem. Soc. Trans.* – 2008. – Vol. 36, № Pt 3. – P. 353-356. doi: 10.1042/BST0360353.

55. Bonner-Weir, S. B-cell growth and regeneration: replication is only part of the story / S. Bonner-Weir, W.C. Li, L. Ouziel-Yahalom, [et al.] // *Diabetes.* – 2010. – Vol. 59. – P. 2340. doi: 10.2337/db10-0084.

56. Bouwens, L. Extra-insular beta cells associated with ductules are frequent in adult human pancreas / L. Bouwens, D.G. Pipeleers // *Diabetologia.* – 1998. – Vol. 41, № 6. – P. 629-33. doi: 10.1007/s001250050960.

57. Bouwens, L. Regulation of pancreatic beta-cell mass / L. Bouwens, I. Rومان // *Physiol. Rev.* – 2005. – Vol. 85, № 4. – P. 1255-1270. doi: 10.1152/physrev.00025.2004.

58. Brennand, K. All beta cells contribute equally to islet growth and maintenance / K. Brennand, D. Huangfu, D. Melton // *PLoS Biol.* – 2007. – Vol. 5, № 7. – P. e163. doi: 10.1371/journal.pbio.0050163.

59. Brereton, M.F. Alpha-, Delta- and PP-cells: Are they the architectural cornerstones of islet structure and co-ordination? / M.F. Brereton, E. Vergari, Q. Zhang, [et al.] // *J. Histochem. Cytochem.* – 2015. – Vol. 63, № 8. – P. 575-591. doi: 10.1369/0022155415583535.

60. Brissova, M. Islet microenvironment, modulated by vascular endothelial growth factor-A signaling, promotes β cell regeneration / M. Brissova, K. Aamodt, P. Brahmachary, [et al.] // *Cell Metab.* – 2014. – Vol. 19, № 3. – P. 498-511. doi: 10.1016/j.cmet.2014.02.001.

61. Brown, R.E. Acinar-islet cells in the exocri pancreas of the adult cat / R.E. Brown, W.J. Still // *Am. J. Dig. Dis.* – 1970. – Vol. 15, № 4. – P. 327-335. doi: 10.1007/BF02239287.

62. Bunn, H.F. The biosynthesis of human hemoglobin A1c. Slow glycosylation of hemoglobin in vivo / H.F. Bunn, D.N. Hancy, S. Kamin, [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 1976. – Vol. 57. – P. 1652-1659. doi: 10.1172/JCI108436.

63. Butler, A.E. Adaptive changes in pancreatic beta cell fractional area and beta cell turnover in human pregnancy / A.E. Butler, L. Cao-Minh, R. Galasso, [et al.] // *Diabetologia*. – 2010. – Vol. 53, № 10. – P. 2167-2176. doi: 10.1007/s00125-010-1809-6.

64. Calderon, B. Dendritic cells in islets of Langerhans constitutively present cell-derived peptides bound to their class II MHC molecules / B. Calderon, A. Suri, M.J. Miller, [et al.] // *PNAS*. – 2008. – Vol. 105, № 16. – P. 6121-6126. doi: 10.1073/pnas.0801973105.

65. Calderon, B. The pancreas anatomy conditions the origin and properties of resident macrophages / B. Calderon, J.A. Carrero, S.T. Ferris, [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2015. – Vol. 212, № 10. – P. 1497-1512. doi: 10.1084/jem.20150496.

66. Campbell, J.E. Mechanisms controlling pancreatic islet cell function in insulin secretion / J.E. Campbell, C.B. Newgard // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2021. – Vol. 22, № 2. – P. 142-158. doi: 10.1038/s41580-020-00317-7.

67. Carvalho, C.P. Histomorphology and ultrastructure of pancreatic islet tissue during in vivo maturation of rat pancreas / C.P. Carvalho, J.C. Martins, D.A. da Cunha, [et al.] // *Ann. Anat.* – 2006. – Vol. 188, № 3. – P. 221-234. doi: 10.1016/j.aanat.2005.10.009.

68. Cavelti-Weder, C. Hyperglycaemia attenuates in vivo reprogramming of pancreatic exocrine cells to beta cells in mice / C. Cavelti-Weder, W. Li, A. Zumsteg, [et al.] // *Diabetologia*. – 2016. – Vol. 59, № 3. – P. 522-532. doi: 10.1007/s00125-015-3838-7.

69. Chazaud B. Macrophages: supportive cells for tissue repair and regeneration / B. Chazaud // *Immunobiology*. – 2014. – Vol. 219, №3. – P. 172-178. doi:10.1016/j.imbio.2013.09.001

70. Chittezhath, M. Islet macrophages are associated with islet vascular remodeling and compensatory hyperinsulinemia during diabetes / M. Chittezhath, D. Gunaseelan, X. Zheng, [et al.] // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2019. – Vol. 317, № 6. – P. E1108-E1120. doi: 10.1152/ajpendo.00248.2019.

71. Cho, J.H. Cilia action in islets: lessons from mouse models / J.H. Cho, J.W. Hughes // *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. – 2022. – Vol. 13. – P. 922983. doi: 10.3389/fendo.2022.922983.

72. Collier, J.J. Pancreatic, but not myeloid-cell, expression of interleukin-1alpha is required for maintenance of insulin secretion and whole body glucose homeostasis / J.J. Collier, H.M. Batdorf, T.M. Martin, [et al.] // *Mol. Metab.* – 2021. – Vol. 44. – P. 101140. doi: 10.1016/j.molmet.2020.101140.

73. Cosentino, C. Crosstalk between macrophages and pancreatic β -cells in islet development, homeostasis and disease / C. Cosentino, R. Regazzi // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22, № 4. – P. 1765. doi: 10.3390/ijms22041765.

74. Cosi, C. Poly(ADP-ribose) polymerase: early involvement in glutamate-induced neurotoxicity in cultured cerebellar granule cells / C. Cosi, H. Suzuki, D. Milani, [et al.] // *J. Neurosci. Res.* – 1994. – Vol. 39, № 1. – P. 38-46. doi: 10.1002/jnr.490390106.

75. Criscimanna, A. Activated macrophages create lineage-specific microenvironments for pancreatic acinar- and β -cell regeneration in mice / A. Criscimanna, G.M. Coudriet, G.K. Gittes, [et al.] // *Gastroenterology*. – 2014. – Vol. 147, № 5. – P. 1106-1118. doi: 10.1053/j.gastro.2014.08.008.

76. Dalmas, E. Innate immune priming of insulin secretion / E. Dalmas // *Curr. Opin. Immunol.* – 2019. – Vol. 56. – P. 44-49. doi: 10.1016/j.coi.2018.10.005.

77. Dalmas, E. Interleukin-33-activated islet-resident innate lymphoid cells promote insulin secretion through myeloid cell retinoic acid production / E. Dalmas, F.M. Lehmann, E. Dror, [et al.] // *Immunity*. – 2017. – Vol. 47, № 5. – P. 928-942. doi: 10.1016/j.immuni.2017.10.015.

78. Danilova, I.G. Accelerated liver recovery after acute CCl₄ poisoning in rats treated with sodium phthalhydrazide / I.G. Danilova, Z.A. Shafigullina, I.F. Gette, [et al.] // *Int. Immunopharmacol.* – 2020. – Vol. 80. – P. 106124. doi: 10.1016/j.intimp.2019.106124.

79. Desgraz, R. β -cell regeneration: the pancreatic intrinsic faculty / R. Desgraz, C. Bonal, P.L. Herrera // *Trends Endocrinol. Metabolism*. – 2011. – Vol. 1, № 22. – P. 34-43. doi: 10.1016/j.tem.2010.09.004.

80. Dios, I.D. Inflammatory role of the acinar cells during acute pancreatitis / I.D. Dios // *World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.* – 2010. – Vol. 1, № 1. – P. 15-20. doi: 10.4292/wjgpt.v1.i1.15.

81. Dolenšek, J. Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas / J. Dolenšek, M.S. Rupnik, A. Stožer // *Islets*. – 2015. – Vol. 7, № 1. – P. e1024405. doi: 10.1080/19382014.2015.1024405.

82. Dor, Y. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation / Y. Dor, J. Brown, O.I. Martinez, [et al.] // *Nature*. – 2004. – Vol. 429, № 6987. – P. 41-46. doi: 10.1038/nature02520.

83. Drigo, R.A.E. Age mosaicism across multiple scales in adult tissues / R.A.E. Drigo, V. Lev-Ram, S. Tyagi, [et al.] // *Cell Metab.* – 2019. – Vol. 30, № 2. – P. 343-351. doi: 10.1016/j.cmet.2019.05.010.

84. Drigo, R.A.E. New insights into the architecture of the islet of Langerhans: a focused cross-species assessment / R.A.E. Drigo, Y. Ali, J. Diez, [et al.] // *Diabetologia*. – 2015. – Vol. 58, № 10. – P. 2218-2228. doi: 10.1007/s00125-015-3699-0.

85. Dror, E. Postprandial macrophage-derived IL-1 β stimulates insulin, and both synergistically promote glucose disposal and inflammation / E. Dror, E. Dalmas, D.T. Meier, [et al.] // *Nat. Immunol.* – 2017. – Vol. 18, № 3. – P. 283-292. doi: 10.1038/ni.3659.

86. Dybala, M.P. Implications of integrated pancreatic microcirculation: crosstalk between endocrine and exocrine compartments / M.P. Dybala, L.R. Gebien, M.E. Reyna, [et al.] // *Diabetes*. – 2020. – Vol. 69, № 12. – P. 2566-2574. doi: 10.2337/db20-0810.

87. Dybala, M.P. Integrated pancreatic blood flow: bidirectional microcirculation between endocrine and exocrine pancreas / M.P. Dybala,

A. Kuznetsov, M. Motobu, [et al.] // *Diabetes*. – 2020. – Vol. 69, № 7. – P. 1439-1450. doi: 10.2337/db19-1034.

88. Dybala, M.P. Pancreatic islets and gestalt principles / M.P. Dybala, J.K. Butterfield, B.K. Hendren-Santiago, [et al.] // *Diabetes*. – 2020. – Vol. 69, № 9. – P. 1864-1874. doi: 10.2337/db20-0304.

89. Egozi, A. Zonation of pancreatic acinar cells in diabetic mice / A. Egozi, K. Bahar Halpern, L. Farack, [et al.] // *Cell Rep*. – 2020. – Vol. 32, № 7. – P. 108043. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108043.

90. El-Gohary, Y. Intraislet pancreatic ducts can give rise to insulin-positive cells / Y. El-Gohary, J. Wiersch, S. Tulachan, [et al.] // *Endocrinology*. – 2016. – Vol. 157, № 1. – P. 166-175. doi: 10.1210/en.2015-1175.

91. El-Gohary, Y. Three-dimensional analysis of the islet vasculature / Y. El-Gohary, S. Sims-Lucas, N. Lath, [et al.] // *Anat. Rec*. – 2012. – Vol. 295. – P. 1473-1481. doi: 10.1002/ar.22530.

92. El-Gohary, Y. Whole-mount imaging demonstrates hypervascularity of the pancreatic ducts and other pancreatic structures / Y. El-Gohary, S. Tulachan, M. Branca, [et al.] // *Anat. Rec. (Hoboken)*. – 2012. – Vol. 295, № 3. – P. 465-473. doi: 10.1002/ar.22420.

93. Fabricio, G. Environmental contaminants and pancreatic beta-cells / G. Fabricio, A. Malta, A. Chango, [et al.] // *J. Clin. Res. Pediatr. Endocrinol*. – 2016. – Vol. 8, № 3. – P. 257-263. doi: 10.4274/jcrpe.2812.

94. Falkmer, S. Phylogenetical aspects on islet hormone families: a minireview with particular reference to insulin as a growth factor and to the phylogeny of PYY and NPY immunoreactive cells and nerves in the endocrine and exocrine pancreas / S. Falkmer, E. Dafgård, M. el-Salhy, [et al.] // *Peptides*. – 1985. – Vol. 6, Suppl 3. – P. 315-320. doi: 10.1016/0196-9781(85)90391-2.

95. Feng, Y. Characterizing pancreatic β -cell heterogeneity in the streptozotocin model by single-cell transcriptomic analysis / Y. Feng, W.L. Qiu, X.X. Yu, [et al.] // *Mol. Metab*. – 2020. – Vol. 37. – P. 100982. doi: 10.1016/j.molmet.2020.100982.

96. Fröde, T.S. Animal models to test drugs with potential antidiabetic activity / T.S. Fröde, Y.S. Medeiros // *J. Ethnopharmacol.* – 2008. – Vol. 115. – P. 173-183. doi: 10.1016/j.jep.2007.10.038.

97. Geutskens, S.B. Macrophages in the murine pancreas and their involvement in fetal endocrine development in vitro / S.B. Geutskens, T. Otonkoski, M.-A. Pulkkinen, [et al.] // *J. Leukocyte Biol.* – 2005. – Vol. 78. – P. 845-852. doi: 10.1189/jlb.1004624.

98. Glick, D. Autophagy: cellular and molecular mechanisms / D. Glick, S. Barth, K.F. Macleod // *J. Pathol.* – 2010. – Vol. 221, № 1. – P. 3-12. doi: 10.1002/path.2697.

99. Gribben, C. Ductal Ngn3-expressing progenitors contribute to adult β cell neogenesis in the pancreas / C. Gribben, C. Lambert, H.A. Messal, [et al.] // *Cell Stem Cell.* – 2021. – Vol. 28, № 11. – P. 2000-2008. doi: 10.1016/j.stem.2021.08.003.

100. Gross, S. Bioluminescence imaging of myeloperoxidase activity in vivo / S. Gross, S.T. Gammon, B.L. Moss, [et al.] // *Nat. Med.* – 2009. – Vol. 15, № 4. – P. 455-461. doi: 10.1038/nm.1886.

101. Guo, N. Short telomeres compromise β -cell signaling and survival / N. Guo, E.M. Parry, L.S. Li, [et al.] // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6, № 3. – P. e17858. doi: 10.1371/journal.pone.0017858.

102. Gurgul-Convey, E. Sensitivity profile of the human EndoC- β H1 beta cell line to proinflammatory cytokines / E. Gurgul-Convey, I. Mehmeti, T. Plötz, [et al.] // *Diabetologia.* – 2016. – Vol. 59, № 10. – P. 2125-2133. doi: 10.1007/s00125-016-4060-y.

103. Hajmrle, C. Interleukin-1 signaling contributes to acute islet compensation / C. Hajmrle, N. Smith, A.F. Spigelman, [et al.] // *JCI Insight.* – 2016. – Vol. 1, № 4. – P. e86055. doi: 10.1172/jci.insight.86055.

104. Heimberg, H. Heterogeneity in glucose sensitivity among pancreatic beta-cells is correlated to differences in glucose phosphorylation rather than glucose

transport / H. Heimberg, A. De Vos, A. Vandercammen, [et al.] // *EMBO J.* – 1993. – Vol. 12, № 7. – P. 2873-2879. doi: 10.1002/j.1460-2075.1993.tb05949.x.

105. Inoue, H. Signaling between pancreatic β cells and macrophages via S100 calcium-binding protein A8 exacerbates β -cell apoptosis and islet inflammation / H. Inoue, J. Shirakawa, Y. Togashi, [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2018. – Vol. 293, № 16. – P. 5934-5946. doi: 10.1074/jbc.M117.809228.

106. Insel RA, Dunne JL, Atkinson MA, et al. Staging presymptomatic type 1 diabetes: a scientific statement of JDRF, the Endocrine Society, and the American Diabetes Association. / Insel RA, Dunne JL, Atkinson MA, [et al.] // *Diabetes Care.* – 2015. – Vol.10, № 38. – P. 1964-1974. doi:10.2337/dc15-1419

107. Islam M.S (ed.), The islets of Langerhans / M.S Islam (ed.) [et al.]. – Springer Dordrecht, 2010. – 654p, eBook ISBN 978-90-481-3271-3., doi: <https://doi.org/10.1007/978-90-481-3271-3>

108. Ismail, Z.M.K. The effect of in vivo mobilization of bone marrow stem cells on the pancreas of diabetic albino rats (a histological & immunohistochemical study) / Z.M.K. Ismail, A.M. Kamel, M.F. Yacoub, [et al.] // *Int. J. Stem Cells.* – 2013. – Vol. 6, № 1. – P. 1-11. doi: 10.15283/ijsc.2013.6.1.1.

109. Italiani, P. From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation / P. Italiani, D. Boraschi // *Front. Immunol.* – 2014. – Vol. 5. – P. 514. doi:10.3389/fimmu.2014.00514.

110. Jensen, D.M. Good cop, bad cop: the opposing effects of macrophage activation state on maintaining or damaging functional β -cell mass / D.M. Jensen, K.V. Hendricks, A.T. Mason, [et al.] // *Metabolites.* – 2020. – Vol. 10, № 12. – P. 485. doi: 10.3390/metabo10120485.

111. Jeon, J. Endocrine cell clustering during human pancreas development / J. Jeon, M. Correa-Medina, C. Ricordi, [et al.] // *J. Histochem. Cytochem.* – 2009. – Vol. 57, № 9. – P. 811-824. doi: 10.1369/jhc.2009.953307.

112. Jetton, T.L. Heterogeneous expression of glucokinase among pancreatic beta cells / T.L. Jetton, M.A. Magnuson // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1992. – Vol. 89, № 7. – P. 2619-2623. doi: 10.1073/pnas.89.7.2619.

113. Jo, J. Formation of pancreatic islets involves coordinated expansion of small islets and fission of large interconnected islet-like structures / J. Jo, G. Kilimnik, A. Kim, [et al.] // *Biophys. J.* – 2011. – Vol. 101. – P. 565-574. doi: 10.1016/j.bpj.2011.06.042.

114. Jukić, T. A tetrahydrophthalazine derivative 'sodium nucleinate' exerts a potent suppressive effect upon LPS-stimulated mononuclear cells in vitro and in vivo / T. Jukić, M. Abidov, A. Ihan // *Coll. Antropol.* – 2011. – Vol. 35, № 4. – P. 1219-1223.

115. Jukić, T. Tetrahydrophthalazine derivative "sodium nucleinate" exert its anti-inflammatory effects through inhibition of oxidative burst in human monocytes / T. Jukić, A. Ihan, D. Jukić // *Coll. Antropol.* – 2012. – Vol. 36, № 2. – P. 409-412.

116. Jurberg, A.D. Neuroendocrine control of macrophage development and function / A.D. Jurberg, V. Cotta-de-Almeida, J.R. Temerozo, [et al.] // *Front. Immunol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 1440. doi: 10.3389/fimmu.2018.01440.

117. Kapur, R. Short-term effects of INGAP and Reg family peptides on the appearance of small β -cells clusters in non-diabetic mice / R. Kapur, T.W. Hojfeldt, T.W. Hojfeldt, [et al.] // *Islets.* – 2012. – Vol. 4, № 1. – P. 40-48. doi: 10.4161/isl.18659.

118. Kaur, K.K. Targeting macrophage polarization for therapy of diabetes – the feasibility of early improvement of insulin sensitivity and insulin resistance-a comprehensive systematic review / K.K. Kaur, G. Allahbadia, M. Singh // *J. Diab. Metab. Disorder Control.* – 2021. – Vol. 8, № 1. – P. 6-25. doi: 10.15406/jdmdc.2021.08.00216

119. Kauri, L.M. Increased islet neogenesis without increased islet mass precedes autoimmune attack in diabetes-prone rats / L.M. Kauri, G.S. Wang, C. Patrick, [et al.] // *Lab. Invest.* – 2007. – Vol. 87, № 12. – P. 1240-1251. doi: 10.1038/labinvest.3700687.

120. Kehm, R. Age-related oxidative changes in pancreatic islets are predominantly located in the vascular system / R. Kehm, J. König, K. Nowotny, [et

al.] // *Redox. Biol.* – 2018. – Vol. 15. – P. 387-393. doi: 10.1016/j.redox.2017.12.015.

121. Kim, A. Islet architecture: a comparative study / A. Kim, K. Miller, J. Jo, [et al.] // *Islets.* – 2009. – Vol. 1, № 2. – P. 129-136. doi: 10.4161/isl.1.2.9480.

122. Kim, S.K. Intercellular signals regulating pancreas development and function / S.K. Kim, M. Hebrok // *Genes Dev.* – 2001. – Vol. 15, № 2. – P. 111-127. doi: 10.1101/gad.859401.

123. Kimura-Nakajima, C. Ngn3-positive cells arise from pancreatic duct cells / C. Kimura-Nakajima, K. Sakaguchi, Y. Hatano, [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22, № 16. – P. 8548. doi: 10.3390/ijms22168548.

124. Kumar, G.L. Education guide. Immunohistochemical (IHC) staining methods / G.L. Kumar, L. Rudbeck // California.: Dako North. – 2009. – 218 p.

125. Kumar, P. Hyperglycemia-induced inflammation caused down-regulation of 8-oxoG-DNA glycosylase levels in murine macrophages is mediated by oxidative-nitrosative stress-dependent pathways / P. Kumar, M.M. Swain, A. Pal // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2016. – Vol. 73. – P. 82-98 doi: 10.1016/j.biocel.2016.02.006.

126. Lang, K.S. Toll-like receptor engagement converts T-cell autoreactivity into overt autoimmune disease / K.S. Lang, M. Recher, T. Junt, [et al.] // *Nat. Med.* – 2005. – Vol. 11, № 2. – P. 138-145. doi: 10.1038/nm1176.

127. Lawlor, N. Single-cell transcriptomes identify human islet cell signatures and reveal cell-type-specific expression changes in type 2 diabetes / N. Lawlor, J. George, M. Bolisetty, [et al.] // *Genome Res.* – 2017. – Vol. 27, № 2. – P. 208-222. doi: 10.1101/gr.212720.116.

128. Lennie, T.A. Activity of body energy regulatory pathways in inflammation-induced anorexia / T.A. Lennie, M.D. Mortman, R.J. Seeley // *Physiol. Behav.* – 2001. – Vol. 73, № 4. – P. 517-523. doi: 10.1016/s0031-9384(01)00480-2.

129. Lenzen, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes / S. Lenzen // *Diabetologia*. – 2008. – Vol. 51, № 2. – P. 216-226. doi: 10.1007/s00125-007-0886-7.
130. Lenzen, S. Thiol-group reactivity, hydrophilicity and stability of alloxan, its reduction products and its N-methyl derivatives and a comparison with ninhydrin / S. Lenzen, R. Munday // *Biochem. Pharmacol.* – 1991. – Vol. 42. – P. 1385-1391. doi: 10.1016/0006-2952(91)90449-f.
131. Ling, Z. Prolonged exposure of human beta cells to elevated glucose levels results in sustained cellular activation leading to a loss of glucose regulation / Z. Ling, D.G. Pipeleers // *J. Clin. Invest.* – 1996. – Vol. 98, № 12. – P. 2805-2812. doi: 10.1172/JCI119108.
132. Lipsett, M. Islet neogenesis: a potential therapeutic tool in type 1 diabetes / M. Lipsett, R. Aikin, M. Castellarin, [et al.] // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* – 2006. – Vol. 38, № 4. – P. 498-503. doi: 10.1016/j.biocel.2005.08.022.
133. Liu, Q. Insulin-positive ductal cells do not migrate into preexisting islets during pregnancy / Q. Liu, Y. Jiang, L. Zhu, [et al.] // *Exp. Mol. Med.* – 2021. – Vol. 53, № 4. – P. 605-614. doi: 10.1038/s12276-021-00593-z.
134. Liu, V.J. Modulation of macrophage proliferation by hyperglycemia / V.J. Liu, A. Saini, D.J. Cohen, [et al.] // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 1995. – Vol. 114, № 1-2. – P. 187-192. doi: 10.1016/0303-7207(95)96799-n.
135. Lo, J.C. Adipsin is an adipokine that improves β cell function in diabetes / J.C. Lo, S. Ljubicic, B. Leibiger, [et al.] // *Cell*. – 2014. – Vol. 158, № 1. – P. 41-53. doi: 10.1016/j.cell.2014.06.005.
136. Lu, J. Cytokines in type 1 diabetes: mechanisms of action and immunotherapeutic targets / J. Lu, J. Liu, L. Li, [et al.] // *Clin. Transl. Immunology*. – 2020. – Vol. 9, № 3. – P. e1122. doi: 10.1002/cti2.1122.
137. Lu, J. Transdifferentiation of pancreatic α -cells into insulinsecreting cells: From experimental models to underlying mechanisms / J. Lu, R. Jaafer, R. Bonnavion, [et al.] // *World J. Diabetes*. – 2014. – Vol. 5, № 6. – P. 847-853. doi: 10.4239/wjd.v5.i6.847.

138. Lubbers, R. Production of complement components by cells of the immune system / R. Lubbers, M.F. van Essen, C. van Kooten, [et al.] // *Clin. Exp. Immunol.* – 2017. – Vol. 188, № 2. – P. 183-194. doi: 10.1111/cei.12952.

139. Lumeng, C.N. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization / C.N. Lumeng, J.L. Bodzin, A.R. Saltiel // *J. Clin. Invest.* – 2007. – Vol. 117, № 1. – P. 175-184. doi: 10.1172/JCI29881.

140. Lungu, G. Monosodium luminol upregulates the expression of Bcl-2 and VEGF in retrovirus-infected mice through downregulation of corresponding miRNAs / G. Lungu, X. Kuang, G. Stoica, [et al.] // *Acta Virol.* – 2010. – Vol. 54, № 1. – P. 27-32. doi: 10.4149/av_2010_01_27.

141. Madec, A-M. Role of mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane (MAMs) interactions and calcium exchange in the development of type 2 diabetes / A-M. Madec, J. Perrier, B. Panthu, [et al.] // *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* – 2021. – Vol. 363. – P. 169-202. doi: 10.1016/bs.ircmb.2021.06.001.

142. Maedler, K. Glucose-induced β cell production of IL-1 β contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets / K. Maedler, P. Sergeev, F. Ris, [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2002. – Vol. 110, № 6. – P. 851-860. doi: 10.1172/JCI15318.

143. Marrif, H.I. Pancreatic β cell mass death / H.I. Marrif, S.I. Al-Sunousi // *Front. Pharmacol.* – 2016. – Vol. 7, Article 83. doi:10.3389/fphar.2016.00083

144. Merkwitz, C. The ductal origin of structural and functional heterogeneity between pancreatic islets / C. Merkwitz, O.W. Blaschuk, A. Schulz, [et al.] // *Prog. Histochem. Cytochem.* – 2013. – Vol. 48. – P. 103-140. doi: 10.1016/j.proghi.2013.09.001.

145. Mezza, T. The regulation of pre- and post-maturational plasticity of mammalian islet cell mass / T. Mezza, R.N. Kulkarni // *Diabetologia.* – 2014. – Vol. 57, № 7. – P. 1291-1303. doi: 10.1007/s00125-014-3251-7.

146. Mills, C.D. Anatomy of a discovery: M1 and M2 macrophages / C.D. Mills // *Front. Immunol.* – 2015. – Vol. 6. – P. 212. doi:10.3389/fimmu.2015.00212.

147. Muratore, M. The vascular architecture of the pancreatic islets: A homage to August Krogh / M. Muratore, C. Santos, P. Rorsman // *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* – 2021. – Vol. 252. – P. 110846. doi: 10.1016/j.cbpa.2020.110846.

148. Nackiewicz, D. Islet macrophages shift to a reparative state following pancreatic beta-cell death and are a major source of islet insulin-like growth factor-1 / D. Nackiewicz, M. Dan, M. Speck, [et al.] // *iScience.* – 2020. – Vol. 23, № 1. – P. 100775. doi: 10.1016/j.isci.2019.100775.

149. Nyman, L.R. Glucose-dependent blood flow dynamics in murine pancreatic islets *in vivo* / L.R. Nyman, E. Ford, A.C. Powers, [et al.] // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2010. – Vol. 298, № 4. – P. E807-E814. doi: 10.1152/ajpendo.00715.2009.

150. Ohtsubo, K. Pathway to diabetes through attenuation of pancreatic beta cell glycosylation and glucose transport / K. Ohtsubo, M.Z. Chen, J.M. Olefsky, [et al.] // *Nat. Med.* – 2011. – Vol. 17, № 9. – P. 1067-1075. doi: 10.1038 /nm.2414.

151. Olsson, R. The pancreatic islet endothelial cell: emerging roles in islet function and disease / R. Olsson, P.O. Carlsson // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2006. – Vol. 38, № 5-6. – P. 710-714. doi: 10.1016/j.biocel.2006.02.004.

152. Peng, S.W. Heterogeneity in mitotic activity and telomere length implies an important role of young islets in the maintenance of islet mass in the adult pancreas / S.W. Peng, L.Y. Zhu, M. Chen, [et al.] // *Endocrinology.* – 2009. – Vol. 150, № 7. – P. 3058-3066. doi: 10.1210/en.2008-1731.

153. Perl, S. Significant human β -cell turnover is limited to the first three decades of life as determined by *in vivo* thymidine analog incorporation and radiocarbon dating / S. Perl, J.A. Kushner, B.A. Buchholz, [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2010. – Vol. 95, № 10. – P. E234–E239. doi: 10.1210 /jc.2010-0932.

154. PubChem Compounds [электр. ресурс] // URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9794222> (дата обращения 16.06.2022)

155. Puri, S. Plasticity and dedifferentiation within the pancreas: development, homeostasis, and disease / S. Puri, A.E. Folias, M. Hebrok // *Cell Stem Cell*. – 2015. – Vol. 16, № 1. – P. 18-31. doi: 10.1016/j.stem.2014.11.001.

156. Qiu, W.L. Deciphering pancreatic islet β cell and α cell maturation pathways and characteristic features at the single-cell level / W.L. Qiu, Y.W. Zhang, Y. Feng, [et al.] // *Cell Metab.* – 2017. – Vol. 25, № 5. – P. 1194-1205. doi: 10.1016/j.cmet.2017.04.003.

157. Rabinovitch, A. Cytokines and their roles in pancreatic islet beta-cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus / A. Rabinovitch, W.L. Suarez-Pinzon // *Biochem. Pharmacol.* – 1998. – Vol. 55, № 8. – P. 1139-1149. doi: 10.1016/s0006-2952(97)00492-9.

158. Robertson, R.P. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes / R.P. Robertson // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279, № 41. – P. 42351-42354. doi: 10.1074/jbc.R400019200.

159. Robertson, R.P. Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection / R.P. Robertson, J. Harmon, P.O. Tran, [et al.] // *Diabetes*. – 2003. – Vol. 52, № 3. – P. 581-587. doi: 10.2337/diabetes.52.3.581.

160. Rojas, J. Pancreatic beta cell death: novel potential mechanisms in diabetes therapy / J. Rojas, V. Bermudez, J. Palmar, [et al.] // *J. Diabetes Res.* – 2018. – Vol. 2018. – P. 9601801. doi: 10.1155/2018/9601801.

161. Roscioni, S.S. Impact of islet architecture on β -cell heterogeneity, plasticity and function / S.S. Roscioni, A. Migliorini, M. Gegg, [et al.] // *Nat. Rev. Endocrinology*. – 2016. – Vol. 12. – P. 695-709. doi: 10.1038/nrendo.2016.147.

162. Salinno, C. CD81 marks immature and dedifferentiated pancreatic β -cells / C. Salinno, M. Büttner, P. Cota, [et al.] // *Mol. Metab.* – 2021. – Vol. 49. – P. 101188. doi: 10.1016/j.molmet.2021.101188.

163. San José, G. Insulin-induced NADPH oxidase activation promotes proliferation and matrix metalloproteinase activation in monocytes/macrophages /

G. San José, J. Bidegain, P.A. Robador, [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2009. – Vol. 46, № 8. – P. 1058-1067. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.01.009

164. Sarapultsev, A.P. Modulation of inflammatory response improves myocardial infarct healing in rats / A.P. Sarapultsev, O.N. Chupakhin, P.A. Sarapultsev, [et al.] // *Curr. Pharm. Des.* – 2014. – Vol. 20, № 12. – P. 1980-1986. doi: 10.2174/13816128113199990492.

165. Sasaki, S. Spatial and transcriptional heterogeneity of pancreatic beta cell neogenesis revealed by a time-resolved reporter system / S. Sasaki, M.Y.Y. Lee, Y. Wakabayashi, [et al.] // *Diabetologia.* – 2022. – Vol. 65, № 5. – P. 811-828. doi:10.1007/s00125-022-05662-0.

166. Schulte, B.M. Phagocytosis of enterovirus-infected pancreatic beta-cells triggers innate immune responses in human dendritic cells / B.M. Schulte, M. Kramer, M. Ansems, [et al.] // *Diabetes.* – 2010. – Vol. 59, № 5. – P. 1182-1191. doi: 10.2337/db09-1071.

167. Seaberg, R.M. Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages / R.M. Seaberg, S.R. Smukler, T.J. Kieffer, [et al.] // *Nat. Biotechnol.* – 2004. – Vol. 22, № 9. – P. 1115-1124. doi: 10.1038/nbt1004.

168. Seeberger, K.L. Identification and differentiation of PDX1 β -cell progenitors within the human pancreatic epithelium / K.L. Seeberger, S.J. Anderson, C.E. Ellis, [et al.] // *World J. Diabetes.* – 2014. – Vol. 5. – P. 59-68. doi: 10.4239/wjd.v5.i1.59.

169. Seino, S. Pancreatic beta-cell signaling: toward better understanding of diabetes and its treatment / S. Seino, T. Shibasaki, K. Minami, [et al.] // *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* – 2010. – Vol. 86, № 6. – P. 563-577. <https://doi.org/10.2183/pjab.86.563>.

170. Sharon, N. A peninsular structure coordinates asynchronous differentiation with morphogenesis to generate pancreatic islets / N. Sharon, R. Chawla, J. Mueller, [et al.] // *Cell.* – 2019. – Vol. 176, № 4. – P. 790-804. doi: 10.1016/j.cell.2018.12.003.

171. Shorr, S.S. Acino-insular cells in normal rat pancreas / S.S. Shorr, F.E. Bloom // *Yale J. Biol. Med.* – 1970. – Vol. 43, № 1. – P. 47-49.

172. Spadaro, O. Gaining weight: insulin-eating islet macrophages / O. Spadaro, V.D. Dixit // *Immunity.* – 2019. – Vol. 50, № 1. – P. 13-15. doi: 10.1016/j.immuni.2018.12.026.

173. Szkudelski, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas / T. Szkudelski // *J. Physiol. Res.* – 2001. – Vol. 50. – P. 536-546.

174. Tessaro, F.H.G. Insulin influences LPS-Induced TNF- α and IL-6 release through distinct pathways in mouse macrophages from different compartments / F.H.G. Tessaro, T.S. Ayala, E.L. Nolasco, [et al.] // *Cell Physiol. Biochem.* – 2017. – Vol. 42, № 5. – P. 2093-2104. doi: 10.1159/000479904.

175. Tessem, J.S. Critical roles for macrophages in islet angiogenesis and maintenance during pancreatic degeneration / J.S. Tessem, J.N. Jensen, H. Pelli, [et al.] // *Diabetes.* – 2008. – Vol. 57, № 6. – P. 1605-1617. doi: 10.2337/db07-1577.

176. Teta, M. Growth and regeneration of adult beta cells does not involve specialized progenitors / M. Teta, M.M. Rankin, S.Y. Long, [et al.] // *Dev. Cell.* – 2007. – Vol. 12, № 5. – P. 817-826. doi: 10.1016/j.devcel.2007.04.011.

177. Thomas, H.E. Interleukin-1 plus gamma-interferon-induced pancreatic beta-cell dysfunction is mediated by beta-cell nitric oxide production / H.E. Thomas, R. Darwiche, J.A. Corbett, [et al.] // *Diabetes.* – 2002. – Vol. 51, № 2. – P. 311-316. doi: 10.2337/diabetes.51.2.311.

178. Tower, J. Programmed cell death in aging / J. Tower // *Ageing Res. Rev.* – 2015. – Vol. 23, № Pt A. – P. 90-100. doi: 10.1016/j.arr.2015.04.002.

179. Tritschler, S. Systematic single-cell analysis provides new insights into heterogeneity and plasticity of the pancreas / S. Tritschler, F.J. Theis, H. Lickert, [et al.] // *Mol. Metab.* – 2017. – Vol. 6, № 9. – P. 974-990. doi: 10.1016/j.molmet.2017.06.021.

180. Tseng, J.C. In vivo imaging method to distinguish acute and chronic inflammation / J.C. Tseng, A.L. Kung // *J. Vis. Exp.* – 2013. – Vol. 78. – P. 50690. doi:10.3791/50690.

181. Ullsten, S. Vascular heterogeneity between native rat pancreatic islets is responsible for differences in survival and revascularisation post transplantation / S. Ullsten, J. Lau, P.O. Carlsson // *Diabetologia.* – 2015. – Vol. 58, № 1. – P. 132-139. doi: 10.1007/s00125-014-3385-7.

182. Vakilian, M. A new shortened protocol to obtain islet-like cells from hESC-derived ductal cells / M. Vakilian, A. Hmadcha, B. Soria, [et al.] // *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* – 2021. – Vol. 57, № 6. – P. 587-597. doi: 10.1007/s11626-021-00580-8.

183. van der Meulen, T. Virgin Beta cells persist throughout life at a neogenic niche within pancreatic islets / T. van der Meulen, A.M. Mawla, M.R. DiGrucchio, [et al.] // *Cell Metab.* – 2017. – Vol. 25, № 4. – P. 911-926. doi: 10.1016/j.cmet.2017.03.017.

184. Van Gassen, N. Concise review: macrophages: versatile gatekeepers during pancreatic β -cell development, injury, and regeneration / N. Van Gassen, W. Staels, E. Van Overmeire, [et al.] // *Stem Cells Transl. Med.* – 2015. – Vol. 4, № 6. – P. 555-563. doi: 10.5966/sctm.2014-0272.

185. Vomund, A.N. Beta cells transfer vesicles containing insulin to phagocytes for presentation to T cells / A.N. Vomund, B.H. Zinselmeyer, J. Hughes, [et al.] // *PNAS.* – 2015. – P. E5497. doi: 10.1073/pnas.1515954112.

186. Wang, Y.J. Single-cell RNA-Seq of the pancreatic islets--a promise not yet fulfilled? / Y.J. Wang, K.H. Kaestner // *Cell Metab.* – 2019. – Vol. 29, № 3. – P. 539-544. doi: 10.1016/j.cmet.2018.11.016.

187. Weitz, J.R. Mouse pancreatic islet macrophages use locally released ATP to monitor beta cell activity / J.R. Weitz, M. Makhmutova, J. Almac¸a, [et al.] // *Diabetologia.* – 2018. – Vol. 61, № 1. – P. 182-192. doi: 10.1007/s00125-017-4416-y.

188. Willcox, A. Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes / A. Willcox, S.J. Richardson, A.J. Bone, [et al.] // *Clin. Exp. Immunol.* – 2009. – Vol. 155, № 2. – P. 173-181. doi: 10.1111/j.1365-2249.2008.03860.x.
189. Xiao, X. M2 macrophages promote beta-cell proliferation by up-regulation of SMAD7 / X. Xiao, I. Gaffar, P. Guo, [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2014. – Vol. 111, № 13. – P. E1211-E1220. doi: 10.1073/pnas.1321347111.
190. Xin, Y. Single-cell RNAseq reveals that pancreatic β -cells from very old male mice have a young gene signature / Y. Xin, H. Okamoto, J. Kim, [et al.] // *Endocrinology.* – 2016. – Vol. 157, № 9. – P. 3431-3438. doi: 10.1210/en.2016-1235.
191. Yang, C. Is a β cell a β cell? / C. Yang, F. Galivo, C. Dorrell // *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* – 2017. – Vol. 24, № 2. – P. 92-97. doi: 10.1097/MED.0000000000000322.
192. Ying, W. Expansion of islet- resident macrophages leads to inflammation affecting beta cell proliferation and function in obesity / W. Ying, Y. Sok Lee, Y. Dong, [et al.] // *Cell Metab.* – 2019. – Vol. 29, № 2. – P. 457-474. doi: 10.1016/j.cmet.2018.12.003.
193. Ying, W. The role of macrophages in obesity-associated islet inflammation and β -cell abnormalities / W. Ying, W. Fu, Y.S. Lee, [et al.] // *Nat. Rev. Endocrinol.* – 2020. – Vol. 16, № 2. – P. 81-90. doi: 10.1038/s41574-019-0286-3.
194. Yoon, J.W. Cellular and molecular pathogenic mechanisms of insulin-dependent diabetes mellitus / J.W. Yoon, H.S. Jun // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 2001. – Vol. 928. – P. 200-211. doi: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb05650.x.
195. Yu, L. Insulin-producing acinar cells in adult human pancreas / L. Yu, J.X. Luo, J.L. Wei, [et al.] // *Pancreas.* – 2014. – Vol. 43, № 4. – P. 592-596. doi: 10.1097/MPA.0000000000000079.
196. Zakharov PN. Single-cell RNA sequencing of murine islets shows high cellular complexity at all stages of autoimmune diabetes / P.N. Zakharov, H. Hu, X.

Wan, E.R. Unanue. // J Exp Med. –2020. – Vol. 217, № 6. – P. e20192362. doi: 10.1084/jem.20192362.

197. Zeng, C. Pseudotemporal ordering of single cells reveals metabolic control of postnatal β cell proliferation / C. Zeng, F. Mulas, Y. Sui, [et al.] // Cell Metab. – 2017. – Vol. 25, № 5. – P. 1160-1175. doi: 10.1016/j.cmet.2017.04.014.

198. Zhou, Q. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells / Q. Zhou, J. Brown, A. Kanarek, [et al.] // Nature. – 2008. – Vol. 455, № 7213. – P. 627-632. doi: 10.1038/nature07314.

ПЕРЕЧЕНЬ ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

Список таблиц

Таблица 1 – Перечень наборов реагентов для проведения иммуноферментного анализа, использованных в работе;

Таблица 2 – Перечень примененных антител, для иммуногистохимического исследования поджелудочной железы экспериментальных животных;

Таблица 3 – Общая морфологическая характеристика поджелудочной железы;

Таблица 4 – Морфофункциональные характеристики ИСК различной локализации в поджелудочной железе;

Таблица 5 – Характеристика панкреатических островков интактных животных с различной функциональной активностью;

Таблица 6 – Гематологические показатели периферической крови экспериментальных животных;

Таблица 7 – Морфометрические показатели островкового аппарата поджелудочной железы экспериментальных животных;

Таблица 8 – Показатели углеводного обмена экспериментальных животных;

Таблица 9 – Гематологические показатели периферической крови экспериментальных животных;

Таблица 10 – Уровень цитокинов в периферической крови экспериментальных животных;

Таблица 11 – Общая морфологическая характеристика поджелудочной железы экспериментальных животных;

Таблица 12 – Распределение инсулин-синтезирующих клеток в 1 мм² паренхимы поджелудочной железы экспериментальных животных;

Таблица 13 – Морфофункциональная характеристика панкреатических островков экспериментальных животных;

Таблица 14 – Характеристика панкреатических островков I типа (с высоким содержанием инсулина в их β -клетках) экспериментальных животных;

Таблица 15 – Характеристика панкреатических островков II типа (со средним содержанием инсулина в их β -клетках) экспериментальных животных;

Таблица 16 – Характеристика панкреатических островков III типа (с низким содержанием инсулина в их β -клетках) экспериментальных животных;

Таблица 17 – Морфофункциональная характеристика агломератов ИСК поджелудочной железы экспериментальных животных;

Таблица 18 – Морфофункциональная характеристика одиночных ИСК поджелудочной железы экспериментальных животных;

Таблица 19 – Сравнительная морфофункциональная характеристика ИСК различной локализации в поджелудочной железе животных на 30-е сутки после введения аллоксана;

Таблица 20 – Морфофункциональная характеристика ИСК различной локализации в поджелудочной железе на 60-е сутки после введения аллоксана;

Таблица 21 – Распределение клеток системы фагоцитирующих мононуклеаров в 1 мм² паренхимы поджелудочной железы экспериментальных животных;

Таблица 22 – Уровень цитокинов в тканях поджелудочной железы экспериментальных животных;

Таблица 23 – Морфофункциональная характеристика инсулин-синтезирующих клеток различной локализации в поджелудочной железе животных с модуляцией функциональной активности макрофагов;

Таблица – 24 Морфофункциональная характеристика инсулин-синтезирующих клеток различной локализации в поджелудочной железе животных с модуляцией функциональной активности макрофагов на фоне повреждения ИСК.

Список рисунков

Рисунок 1 – Схема образования островков в результате деления тяжёлой структуры во время развития плода и новорожденного [82];

Рисунок 2 – Схема паракринных и аутокринных сигнальных путей в островках Лангерганса млекопитающих [33];

Рисунок 3 – Схематическое изображение кровоснабжения панкреатического островка в зависимости от его расположения [143];

Рисунок 4 – Одна из предложенных моделей связи макрофагов с β -клетками панкреатического островка [183];

Рисунок 5 – Схема основных механизмов восстановления функциональной массы β -клеток *in situ* [175];

Рисунок 6 – Иммуногистохимическое окрашивание на маркер макрофагов CD-68 поджелудочной железы крысы на 60-е сутки после введения аллоксана;

Рисунок 7 – Иммуногистохимическое окрашивание препарата поджелудочной железы интактного животного на инсулин;

Рисунок 8 - Двойное иммуногистохимическое окрашивание пролиферирующей β -клетки (Ki-67 + инсулин) панкреатического островка интактной крысы;

Рисунок 9 – Двойное иммуногистохимическое окрашивание апоптотирующей β -клетки (TUNEL + инсулин) панкреатического островка крысы на 30-е сутки после введения аллоксана;

Рисунок 10 – Двойное иммуногистохимическое окрашивание макрофагов (CD-68) и β -клеток (инсулин) панкреатического островка крысы на 30-е сутки после введения аллоксана;

Рисунок 11 – Инсулин-синтезирующие структуры поджелудочной железы интактного животного;

Рисунок 12 – Соотношение инсулин-синтезирующих структур в паренхиме поджелудочной железы интактных животных;

Рисунок 13 – Содержание глюкозы и гликозилированного гемоглобина в периферической крови экспериментальных животных;

Рисунок 14 – Микрофотографии образцов поджелудочной железы экспериментальных животных на 3-и и 7-е сутки после введения аллоксана;

Рисунок 15 – Изменение общего веса экспериментальных животных в динамике исследования;

Рисунок 16 – Микрофотографии образцов поджелудочной железы экспериментальных животных на 30-е и 60-е сутки после введения аллоксана;

Рисунок 17 – Изменение содержания инсулин-синтезирующих структур в 1 мм² паренхимы поджелудочной железы экспериментальных животных;

Рисунок 18 – Распределение островков с различной синтетической активностью у экспериментальных животных;

Рисунок 19 – Сравнительная характеристика панкреатических островков с различной синтетической активностью у экспериментальных животных на 30-е сутки после введения аллоксана;

Рисунок 20 – Сравнительная характеристика панкреатических островков с различной синтетической активностью у экспериментальных животных на 60-е сутки после введения аллоксана;

Рисунок 21 – Соотношение процессов пролиферации и апоптоза β -клеток в панкреатических островках различного типа у крыс с введением АДФН в физиологических условиях;

Рисунок 22 – Соотношение процессов пролиферации и апоптоза β -клеток в панкреатических островках с различным содержанием инсулина у экспериментальных животных с введением АДФН на фоне повреждения инсулин-синтезирующей системы;

Рисунок 23 – Схема взаимного влияния ИСК и их микроокружения.