

На правах рукописи

**СОКОЛОВА КСЕНИЯ ВИКТОРОВНА**

**ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ МАКРОФАГАЛЬНОЙ РЕГУЛЯЦИИ  
ОБРАЗОВАНИЯ ВНЕОСТРОВКОВЫХ ИНСУЛИН-ПОЗИТИВНЫХ КЛЕТОК  
ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ  
ДИАБЕТЕ ВТОРОГО ТИПА**

14.03.03 – патологическая физиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Екатеринбург – 2021

Работа выполнена на кафедре медицинской биохимии и биофизики Института естественных наук и математики ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина» Минобрнауки РФ и в лаборатории морфологии и биохимии ФГБУН Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук Минобрнауки РФ.

**Научный руководитель:**

Доктор биологических наук, доцент

**Данилова Ирина Георгиевна**

**Официальные оппоненты:**

Доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой клинической биохимии и лабораторной диагностики факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава РФ

**Бутолин**

**Евгений Германович**

Доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук (филиал ФГБОУ Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН)

**Заморина**

**Светлана Анатольевна**

**Ведущая организация:** ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского» Минобрнауки РФ (г. Симферополь)

Защита диссертации состоится «16» июня 2021 года в 10-00 часов на заседании Совета по защите диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук, на соискание учёной степени доктора наук Д 004.027.02 на базе ФГБУН Институт иммунологии и физиологии УрО РАН (620049, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106).

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке УрО РАН (620041, г. Екатеринбург, ул. С. Ковалевской, д. 22/20) и на сайте ИИФ УрО РАН (<http://iip.uran.ru>), с авторефератом – там же и на сайте ВАК РФ (<http://vak2.ed.gov.ru>).

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 года

Учёный секретарь Совета Д.004.027.02  
на базе Института иммунологии и физиологии УрО РАН,  
доктор медицинских наук, профессор, ЗДН РФ

**И.А. Тузанкина**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность и степень разработанности темы исследования

Сахарный диабет второго типа (СД2) – метаболическое заболевание, характеризующееся хронической гипергликемией, возникающей вследствие нарушения секреции инсулина на фоне развития инсулинорезистентности (ВОЗ, 1999; ВОЗ, 2006). Широкая распространённость СД2 и неуклонно увеличивающееся количество больных по всему миру обуславливают актуальность изучения патогенеза СД2 и необходимость поиска новых подходов к его лечению. Инсулинорезистентность снижает секреторные возможности бета-клеток ( $\beta$ -клеток) островков Лангерганса поджелудочной железы, что приводит к нарастанию гипергликемии и прогрессированию диабета (Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П., 2001; Белоусова О.Н. и соавт., 2015). Дисфункция  $\beta$ -клеток, по-видимому, занимает крайне важное место в патогенезе СД2, что нашло отражение в сформулированной в 2016 году  $\beta$ -клеточно-ориентированной модели развития СД2 (Schwartz S. et al., 2016), согласно которой прогрессирующее снижение массы и функционального резерва  $\beta$ -клеток является одним из основных патогенетических механизмов развития СД2. В последнее время исследователи приходят к заключению, что дисфункция  $\beta$ -клеток при СД2 может быть отчасти компенсирована образованием новых инсулин-продуцирующих клеток. В связи с этим всё большее внимание привлекают расположенные вне островков Лангерганса клетки, содержащие инсулин. В современной научной литературе их принято называть инсулин-позитивными клетками (ИПК) по результатам иммуногистохимического исследования ткани поджелудочной железы с использованием антител к инсулину и проинсулину (Bogdani M. et al., 2003; El-Gohary Y. et al., 2016; Beamish C.A. et al., 2016; Sokolova K. et al., 2018). В литературе отмечено сниженное по сравнению с  $\beta$ -клетками количество GLUT2 рецепторов на мембране внеостровковых ИПК (Beamish C.A. et al., 2016) и их меньшая уязвимость по сравнению с  $\beta$ -клетками островков в условиях аллоксанового СД (Булавинцева Т.С. и соавт., 2018). В ряде работ продемонстрирована нормализация гипергликемии при СД на фоне увеличения количества внеостровковых ИПК (Tang D.-Q. et al., 2004; Xin Y. et al., 2016). Однако, морфофункциональная характеристика внеостровковых ИПК в условиях СД2 в литературе отсутствует. Возможно, они являются частью диффузной эндокринной системы, значение и функции которой в норме и при патологии не известны.

В литературе рассматриваются два потенциальных источника данного типа клеток: дифференцировка стволовых клеток и трансдифференцировка клеток экзокринного и протокового эпителия поджелудочной железы, возможная благодаря их функциональной пластичности. Ацинарные клетки являются привлекательной мишенью для трансдифференцировки в ИПК в силу своей многочисленности, единства

происхождения с  $\beta$ -клетками (Houbracken I., Bouwens L., 2010; Houbracken I. et al., 2011) и наличия общих для всех клеток поджелудочной железы транскрипционных факторов, определяющих их дифференцировку и созревание (Puri S. et al., 2010; Dassaye R. et al., 2016).

Факты, подтверждающие пластичность клеток поджелудочной железы в постнатальном периоде, широко описаны в литературе (Puri S., Nebrok M., 2010). Предполагают, что ключевыми регуляторами дифференцировки панкреоцитов являются факторы транскрипции Pdx1, Neurogenin3 (Ngn3) и MafA, что подтверждается трансдифференцировкой ацинарных и протоковых клеток поджелудочной железы в ИПК путём усиления экспрессии представителей триады этих генов (Zhu Y. et al., 2017; Azzarelli R. et al., 2018). Основная роль в развитии поджелудочной железы в эмбриональном и постнатальном периоде принадлежит Pdx1 (Taniguchi H. et al., 2003; Noguchi H. et al., 2003), присутствие которого обязательно не только для дифференцировки клеток железы в инсулин-продуцирующие, но и для их функционирования, что подтверждается регистрируемым увеличением содержания Pdx1 в зрелых  $\beta$ -клетках (Samson S.L., Chan L., 2006). У взрослых животных активность гена *pdx1* снижается в экзокринной части железы и выражена только в зрелых  $\beta$ -клетках (Hui H., Perfetti R., 2002).

Вопрос образования ИПК из плюрипотентных стволовых клеток (Liew C.G., 2010; Soria V. et al., 2015) является дискуссионным. На пролиферацию гемопоэтических стволовых клеток и их миграцию из костного мозга в повреждённые органы, регенерации которых они способствуют, оказывает влияние состояние SCF/c-kit оси. Фактор стволовой клетки (SCF) – цитокин, продуцируемый стволовыми клетками костного мозга и фибробластами, является лигандом рецептора фактора роста тучных и стволовых клеток c-kit (CD117). Предполагают, что активация SCF/c-kit оси является одним из механизмов регуляции регенерации, результатом которой является выход гемопоэтических стволовых клеток из костного мозга и их миграция в ткани повреждённого органа. Однако известно, что экспрессия c-kit дифференцированными клетками является органоспецифической (Казакова И.А., 2014). Ранее на моделях повреждения печени и почек было показано, что вещества, синтезируемые макрофагами, способны провоцировать выход стволовых клеток из костного мозга и их миграции к повреждённому органу, что может способствовать репарационным процессам в тканях (Казакова И.А., 2014; Юшков Б.Г., Климин В.Г., 2017).

Механизмы и условия, способствующие образованию внеостровковых ИПК, до конца не известны. Предположение об участии макрофагов в регулировании образования внеостровковых ИПК поджелудочной железы при СД2 можно обосновать рядом фактов. Во-первых, известно, что СД2 является хроническим воспалительным

заболеванием и его развитие сопровождается макрофагальной инфильтрацией поджелудочной железы (Donath M.Y. et al., 2013; Böni-Schnetzler M., Meier D.T., 2019). Между тем, показано, что репрограммирование экзокринных клеток поджелудочной железы в инсулин-продуцирующие возможно лишь при ограничении выработки макрофагами провоспалительных цитокинов (Clayton H.W., 2010). Во-вторых, доказано, что макрофаги способствуют рекрутированию стволовых клеток и их миграции в повреждённые органы (Казакова И.А., 2014; Юшков Б.Г., Климин В.Г., 2017), а также сами способны вырабатывать фактор стволовой клетки (Shen S.Q. et al., 2017). В-третьих, доказано влияние активности макрофагов на пролиферацию  $\beta$ -клеток островков Лангерганса (Criscimanna A. et al., 2014; Brissova M. et al., 2014; Cao X. et al., 2014; Danilova I.G. et al., 2017).

Наличие доказательств участия макрофагов в образовании инсулин-продуцирующих клеток ставит вопрос о конкретных механизмах макрофагальной регуляции образования именно внеостровковых ИПК поджелудочной железы. Среди множества биологически активных веществ, секретируемых макрофагами, для исследования механизмов воздействия макрофагов на внеостровковые ИПК поджелудочной железы при СД2 особый интерес представляют те, с помощью которых макрофаги могут влиять на функционирование и пролиферацию островковых  $\beta$ -клеток. При СД2 IFN- $\gamma$ , действуя совместно с другими цитокинами, в частности, с TNF- $\alpha$ , индуцирует апоптоз  $\beta$ -клеток островков Лангерганса (Gysemans C. et al., 2008). TNF- $\alpha$  является провоспалительным цитокином, повышенная секреция которого усугубляет развитие инсулинорезистентности при СД2 (Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П., 2001; Alzamil H., 2020). Макрофаги высвобождают TNF- $\alpha$  в условиях воспаления и в постпрандиальный период. TNF- $\alpha$  действует на  $\beta$ -клетки, изменяя выработку и секрецию инсулина (Denroche H.C. et al., 2018). Напротив, TGF- $\beta$ 1 способствует пролиферации  $\beta$ -клеток, он высвобождается макрофагами в островках Лангерганса при снижении количества  $\beta$ -клеток. Представители семейства TGF- $\beta$  могут модулировать развитие поджелудочной железы, участвуя в регуляции количественного баланса эндокринных и экзокринных клеток железы. Моноциты и макрофаги являются основными источниками белков TGF- $\beta$  (Москалёв А.В. и соавт., 2016). Предполагают, что макрофаги могут использовать TGF- $\beta$ 1 как сигнальную молекулу, способствующую пролиферации  $\beta$ -клеток и регенерации поджелудочной железы (Van Gassen N. et al., 2015; Denroche H.C. et al., 2018). Показано, что совместное действие лиганда TGF- $\beta$  активина и ретиноевой кислоты регулирует развитие эпителия поджелудочной железы (Kim S.K. et al., 2000). На более поздних этапах эмбрионального развития белки TGF- $\beta$  выступают в качестве сигнальных молекул, определяющих дифференцировку клеток по экзо- или эндокринному сценарию (Sanvito et al., 1994; Puri S., Hebrok M., 2010).

Таким образом, предположение, что макрофаги, активно принимающие участие в процессах воспаления и регенерации, могут регулировать образование и функционирование внеостровковых ИПК поджелудочной железы при СД2, вполне обосновано и подтверждается экспериментальными данными. Изучение внеостровковых ИПК поджелудочной железы и механизмов регуляции их образования и активности со стороны макрофагального звена являются важными направлениями, которые могут иметь прикладное значение для терапии СД2.

Нельзя не отметить, что специфическое воздействие на макрофаги *in vivo* не является тривиальной задачей. В качестве агента, изменяющего активность макрофагального звена, была выбрана натриевая соль 5-амино-2,3-дигидрофталазин-1,4-диона (аминофталгидразид натрия), идентификационный номер в PubChem (PubChemCID) 9794222, InChI Key: JKEBMURXLKGPLR-UHFFFAOYSA-N, основной фармакологической мишенью которого являются макрофаги. Аминофталгидразид натрия (*далее – АФГ*) изменяет функционально-метаболическую активность макрофагов *in vitro* и *in vivo*, подавляя продукцию воспалительных цитокинов (Абидов М.Т., 1994; Jukic T.A. et al., 2011; Abidov et al., 2013; Поздина с соавт., 2020].

**Цель исследования** – выявить отдельные патофизиологические механизмы макрофагальной регуляции образования и функционирования внеостровковых инсулин-позитивных клеток поджелудочной железы при экспериментальном сахарном диабете второго типа и при коррекции аминофталгидразидом натрия.

Для достижения поставленной цели были решены следующие **задачи**:

1. Дать сравнительную характеристику локализации, количества, размеров и функциональной активности внеостровковых инсулин-позитивных клеток поджелудочной железы в норме и при экспериментальном сахарном диабете второго типа.

2. Дать оценку влияния макрофагов и изменения их активности под действием аминофталгидразида натрия на локализацию, количество, размеры и функциональную перестройку внеостровковых инсулин-позитивных клеток поджелудочной железы в условиях экспериментального сахарного диабета второго типа.

3. Оценить вклад макрофагов и изменения их активности под действием аминофталгидразида натрия в регуляцию образования внеостровковых инсулин-позитивных клеток поджелудочной железы под действием цитокинов и ростовых факторов в крови и ткани железы при экспериментальном сахарном диабете второго типа.

4. Оценить влияние макрофагов и изменения их активности под действием аминофталгидразида натрия на регуляцию количества клеток в составе ацинусов и в



эпителии протоков поджелудочной железы, экспрессирующих транскрипционный фактор Pdx1 и рецептор к фактору стволовой клетки (c-kit).

5. Проанализировать отдельные патофизиологические механизмы макрофагальной регуляции образования и функционирования внеостровковых инсулин-позитивных клеток поджелудочной железы при экспериментальном сахарном диабете второго типа.

**Научная новизна.** В ходе исследования впервые дана характеристика субпопуляций инсулин-позитивных клеток (ИПК) в составе ацинусов и в эпителии протоков поджелудочной железы крыс, включающая их количество, размеры и функциональную активность, в норме и при развитии экспериментального сахарного диабета второго типа. Установлено, что большая часть внеостровковых ИПК поджелудочной железы локализована в ацинусах железы, тогда как в эпителии протоков их количество значительно меньше.

Впервые проанализировано влияние макрофагов на содержание Pdx1-позитивных клеток в составе ацинусов и в эпителии протоков поджелудочной железы. Выявлено, что снижение макрофагальной инфильтрации ацинарной части поджелудочной железы, наблюдаемое при воздействии аминофталгида натрия, способствует увеличению количества Pdx1-позитивных клеток в паренхиме неэндокринной части железы и сопровождается ростом содержания TGF- $\beta$ 1 в ткани железы. Сочетание этих факторов приводит к увеличению количества ИПК в эпителии ацинусов и протоков железы, а также возрастанию их функциональной активности. Отмеченные изменения ИПК могут являться одной из причин увеличения продукции инсулина, снижения гипергликемии и инсулинорезистентности, наблюдаемых при воздействии на функциональное состояние макрофагов при СД2.

Впервые проанализировано влияние со стороны макрофагального звена на количество клеток в составе ацинусов и в эпителии протоков поджелудочной железы, экспрессирующих рецептор к фактору стволовой клетки в условиях экспериментального СД2.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Полученные результаты носят фундаментальный характер. Они расширяют существующие представления об ИПК поджелудочной железы и о роли макрофагов в их образовании и функционировании. Полученные данные свидетельствуют, что при развитии СД2 количество как ацинарных, так и протоковых ИПК снижается, несмотря на выраженную макрофагальную инфильтрацию органа. Воздействие на макрофаги аминофталгида натрия приводит к уменьшению макрофагальной инфильтрации ацинарной части железы без существенного изменения количества макрофагов в её

протоках, что способствует увеличению как количества внеостровковых ИПК, так и усилению их функциональной активности.

Выявлено влияние макрофагов на образование и функционирование внеостровковых ИПК через увеличение содержания в ацинарных клетках и клетках эпителия протоков белка Pdx1 – основного фактора транскрипции, контролирующего образование ИПК, а также через воздействие на продукцию TGF- $\beta$ 1, одного из факторов, регулирующего трансдифференцировку клеток поджелудочной железы в эндокринные.

Проведенное исследование создает теоретическую основу для разработки методов стимулирования образования и функциональной активности ИПК путем изменения функциональной активности макрофагов. Результаты исследования могут быть использованы при разработке новых способов терапии инсулин-дефицитных состояний.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. При развитии экспериментального сахарного диабета второго типа одиночные или собранные в группы инсулин-позитивные клетки обнаруживаются в составе ацинусов и в эпителии протоков поджелудочной железы в тех же соотношениях, что и у интактных животных. Снижение общего количества внеостровковых инсулин-позитивных клеток при развитии экспериментального сахарного диабета второго типа инвариантно к их локализации.

2. Снижение количества внеостровковых инсулин- и Pdx1-позитивных клеток при экспериментальном сахарном диабете второго типа происходит на фоне усиления макрофагальной инфильтрации ацинусов, сопровождаемого ростом содержания TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  и снижением концентрации TGF- $\beta$ 1 в ткани железы.

3. Уменьшение макрофагальной инфильтрации ацинусов поджелудочной железы, снижение концентрации TNF- $\alpha$  и увеличение продукции TGF- $\beta$ 1 в ткани железы под действием амнофтальгида натрия сопровождается ростом числа Pdx1-позитивных клеток, количества и функциональной активности инсулин-позитивных клеток в составе ацинусов и в эпителии протоков.

4. Макрофагальная регуляция образования и функционирования внеостровковых инсулин-позитивных клеток поджелудочной железы осуществляется посредством изменения содержания в ткани железы провоспалительных цитокинов, ростовых факторов, количества Pdx1-позитивных ацинарных и протоковых клеток.

**Внедрение результатов исследования в практику.** Результаты диссертационной работы используются в учебном процессе курса «Патохимия, диагностика» на кафедре медицинской биохимии и биофизики Института естественных наук и математики ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина» Министерства науки и высшего образования РФ (далее – УрФУ имени



*первого Президента России Б.Н. Ельцина*), а также в научно-исследовательской работе лаборатории морфологии и биохимии ФГБУН Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук Министерства науки и высшего образования РФ (далее – ИИФ УрО РАН).

**Достоверность полученных результатов.** Теоретические установки, положенные в основу работы, выведены на основании анализа большого объема современной научной литературы по исследуемому вопросу, что обосновывает направление исследования. Выбор адекватных поставленным задачам методов исследования, достаточный объем выборки, использование современных методов статистической обработки материала, воспроизводимость результатов и не противоречие их данным, представленным в независимых источниках другими авторами, подтверждают верность сделанных в ходе работы выводов. Научные положения и выводы, резюмирующие работу, соответствуют заявленной цели и задачам.

**Личный вклад автора** состоит в непосредственном выполнении всех этапов диссертационного исследования. Постановка научной проблемы и формулировка рабочей гипотезы, разработка дизайна эксперимента, анализ и интерпретация полученных результатов проводились совместно с научным руководителем, доктором биологических наук, доцентом И.Г. Даниловой. Поиск и анализ литературы по теме исследования, получение и статистическая обработка первичных данных, написание и оформление диссертации выполнено автором самостоятельно. Результаты исследования в виде публикаций в научных периодических изданиях и докладов на конференциях представлены совместно с соавторами.

**Апробация работы.** Основные положения диссертационной работы были доложены и обсуждены на X Всероссийском конгрессе студентов и аспирантов-биологов с международным участием «Симбиоз Россия 2017» (Россия, Казань, 2017); XIII Всероссийской конференции с международным участием «Иммунологические чтения в г. Челябинске» (Россия, Челябинск, 2018); 16 Всемирном фармакологическом Конгрессе (16th Annual Congress of International Drug Discovery Science & Technology) (2018, Цзинань, Китай); 30 Конгрессе Европейского Общества патологов (30th Congress of the ESP) (Испания, Бильбао, 2018); 14 Всемирном Конгрессе по эндокринологии и диабету (14th World Congress on Endocrinology and Diabetes) (Франция, Париж, 2018); 2019 Уральском Симпозиуме по Биомедицинской Инженерии, Радиоэлектронике и Информационным Технологиям (2019 Ural Symposium on Biomedical Engineering, Radioelectronics and Information Technology (USBREIT)) (Россия, Екатеринбург, 2019); 15 Всемирном Конгрессе по эндокринологии и диабету (15th World Congress on Endocrinology and Diabetes) (Чешская Республика, Прага, 2019); 2020 Уральском

Симпозиуме по Биомедицинской Инженерии, Радиоэлектронике и Информационным Технологиям (2020 Ural Symposium on Biomedical Engineering, Radioelectronics and Information Technology (USBEREIT)) (Россия, Екатеринбург, 2020); IV Международной научно-практической конференции «Современные синтетические методологии для создания лекарственных препаратов и функциональных материалов» (Екатеринбург, 2020), 32 Конгрессе Европейского Общества патологов (32nd Congress of the ESP and XXXIII International Congress of the IAP) (virtual, 2020).

**Публикации.** По теме диссертационной работы опубликовано 15 печатных работ, в том числе 3 в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ. Большинство работ опубликовано в изданиях, индексируемых в международных наукометрических базах: 5 – в Scopus, 4 – в Web of Science, 3 – в Pubmed, 7 – в РИНЦ.

**Конкурсная поддержка.** Работа поддержана грантами РФФИ № 16-15-00039 и № 16-15-00039-П.

**Объём и структура диссертации.** Диссертация изложена на 160 страницах печатного текста и состоит из введения, обзора литературы по исследуемому вопросу, описания экспериментальных животных и методики эксперимента, 4 глав с результатами собственных исследований, заключения, выводов и списка использованной литературы, включающего 304 источника, среди которых 48 русскоязычных и 256 англоязычных. Работа содержит 18 таблиц и 8 рисунков.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Методические вопросы исследования.** Эксперименты выполнены на белых половозрелых крысах-самцах линии Вистар ( $n = 126$ ) возрастом 12–13 недель. Все манипуляции с животными выполнялись в соответствии с этическими принципами и нормативными документами Директивы Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС, Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (приложение к приказу Минздрава СССР от 12.08.1977 г. № 755) и Федерального закона РФ «О защите животных от жестокого обращения» от 01.01.1997 г. На проведение исследования получено разрешение Этического Комитета ИИФ УрО РАН (протокол № 07/19 от 18.12.2019 г.) и Комиссии по биоэтике УрФУ имени первого Президента России Б.Н. Ельцина (протокол № 2 от 21.10.2020).

Экспериментальные животные были распределены на группы, среди которых в двух были крысы с экспериментальным сахарным диабетом второго типа продолжительностью 30 ( $n = 25$ ) и 60 суток ( $n = 25$ ) соответственно. С целью воздействия на макрофаги в третьей группе животных ( $n = 25$ ) через 30 суток после введения диabetогена проведена серия из 20 внутримышечных инъекций модулятора активности макрофагов натриевой соли 5-амино-2,3-дигидрофталазин-1,4-диона

(аминофталгидразид натрия, далее – АФГ) в дозе 2 мг/кг по установленной схеме (Danilova I. G., 2017). АФГ тропен к фагоцитирующим клеткам, его основной фармакологической мишенью в условиях хронического воспаления являются макрофаги (Gross S., 2003; Tseng J.C., Kung A.L., 2013). АФГ снижает уровень провоспалительных цитокинов (Jukic T.A. et al., 2011; патент US8536171B2 от 17.09.2013) и усиливает пролиферацию  $\beta$ -клеток в островках Лангерганса при аллоксановом диабете (Danilova I.G., 2017). Одна группа оставлена в качестве интактной ( $n = 25$ ). К группе с введением АФГ была поставлена контрольная группа ( $n = 10$ ), исследуемые показатели в данных группах не отличались. 16 крыс использовали для апробации и верификации модели СД2.

Моделирование СД2 производилось путём внутрибрюшинного введения стрептозотоцина, растворённого в цитратном буфере (рН 4,5) в дозе 65 мг/кг массы тела животного с предварительным (за 15 минут) введением раствора никотинамида в воде (Спасов А.А., 2011; Islam M.S., 2012) в дозе 110 мг/кг. Животных выводили из эксперимента после двенадцатичасового голодания передозировкой золетила (15 мг/кг), предварительно взяв кровь из хвостовой вены. После проведения срединной лапаротомии у животных извлекали поджелудочную железу. Фрагменты ткани железы фиксировали в десятипроцентном нейтральном забуференном водном растворе формальдегида в течение 24 часов. После восьмичасовой промывки фрагменты органа подвергали стандартной гистологической проводке в автоматизированном тканевом процессоре Leica TP 1020 (Leica Microsystems, Германия) с последующей заливкой материала в парафин в системе Leica EG 1160 (Leica Microsystems, Германия). Срезы толщиной 3–4 мкм изготавливали на микротоме Leica SM 2000R (Leica Microsystems, Германия).

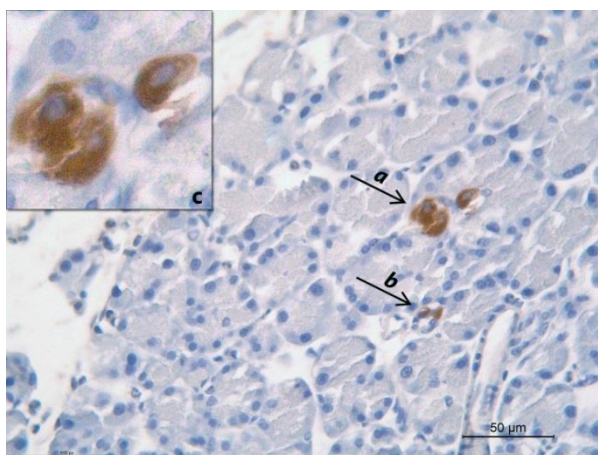
В крови животных определяли концентрацию глюкозы, инсулина, кортикостерона, TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  и SCF, относительное содержание гликированного гемоглобина (HbA<sub>1c</sub>) и количество лейкоцитов. Концентрацию глюкозы определяли глюкозооксидазным методом, инсулина, TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  и SCF – методом твёрдофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием прибора LAZURITE AUTOMATED ELISA SYSTEM (Dy nex Technologies Inc., США), HbA<sub>1c</sub> – методом аффинной хроматографии. Общее количество лейкоцитов определяли на гематологическом анализаторе Celly 70 (Biocode Hycel, Франция), адаптированном для ветеринарных исследований.

Для верификации модели СД2 проводили глюкозотолерантный тест (Peterson R.G., 2015) и рассчитывали индекс HOMA-IR, используемый для оценки инсулинорезистентности, по формуле (Matthews D.R. et al., 1985):

$$\text{НОМА-IR} = \frac{\text{инсулин натощак(мкЕд/мл)} \times \text{глюкоза натощак(ммоль/л)}}{22,5}$$

Иммуногистохимическое исследование поджелудочной железы проводили с использованием антител к инсулину и проинсулину (clone INS04+INS05, Invitrogen, США), макрофагальному маркеру F4/80 (Thermo Fisher Scientific, США), фактору транскрипции Pdx1 (Abcam, США) и рецептору фактора роста стволовых клеток c-kit (Biorbyt, Великобритания) по стандартным протоколам (Kumar G.L., Rudbeck L., 2011). Связь макрофагального маркера F4/80 с образованием Т-регуляторных клеток (Linn H.H. et al, 2005) позволяет предположить участие F4/80-позитивных макрофагов в развитии воспалительных реакций. Выявление инсулина, F4/80 и c-kit осуществляли непрямым пероксидазным методом, а Pdx1 – с использованием козых IgG (H+L) к антигенам мыши, конъюгированных с флуоресцентным красителем (Thermo Fisher, США). Для проверки протоколов и исключения неспецифического окрашивания проводили постановку негативного и позитивного контролей (Hewitt S.M. et al., 2004; Kumar G.L., Rudbeck L., 2011).

Под внеостровковыми ИПК в работе понимались клетки, расположенные в составе эпителия ацинусов (ацинарные ИПК) и протоков (протоковые ИПК) поджелудочной железы, в которых при иммуногистохимическом исследовании с применением антител к инсулину и проинсулину выявлялось позитивное окрашивание (*рисунок 1*). В ходе морфометрического исследования поджелудочной железы подсчитывалось количество единичных и собранных малыми группами (до 5 штук) ИПК ацинарной и протоковой локализации на мм<sup>2</sup> паренхимы железы (N/mm<sup>2</sup>). Исследование ИПК включало определение их площади (мкм<sup>2</sup>) и функциональной активности, которая оценивалась путём измерения оптической плотности цитоплазмы инсулин-позитивной области клеток. Величину оптической плотности выражали в условных единицах в программе ВидеоТест Морфология 5.0 (ООО «ВидеоТест», Россия). Подсчёт количества макрофагов, Pdx1- и c-kit-позитивных клеток в эпителии ацинусов и протоков железы вели в 20 полях зрения с перерасчётом на мм<sup>2</sup> паренхимы поджелудочной железы (N/mm<sup>2</sup>). Оценку гистологических препаратов проводили с использованием микроскопов Leica DM2500 и Carl Zeiss LSM 710 и программных пакетов для захвата и анализа изображений Leica Application Suite и Zen 2010 при увеличении в 400 раз.



**Рисунок 1 – Инсулин-позитивные клетки в паренхиме поджелудочной железы крысы**

Примечание: иммуногистохимическое окрашивание среза поджелудочной железы с использованием антител к проинсулину и инсулину, контрастное докрасивание гематоксилином. Цитоплазма инсулин-позитивных клеток имеет коричневое окрашивание. Стрелками показаны инсулин-позитивные клетки: а – в ацинусе железы; б – в протоке железы. С – увеличенный фрагмент. Увеличение  $\times 400$

Ткань поджелудочной железы промывали ледяным фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) с pH 7,4 и гомогенизировали с помощью системы для дезагрегации тканей BD Medimachine (Becton Dickinson, США). Полученный после центрифугирования в течение 30 минут при 15000 оборотах в минуту при температуре  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  в центрифуге Sigma 3K30 (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Германия) супернатант подвергали иммуноферментному исследованию для определения содержания TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  и SCF в ткани поджелудочной железы.

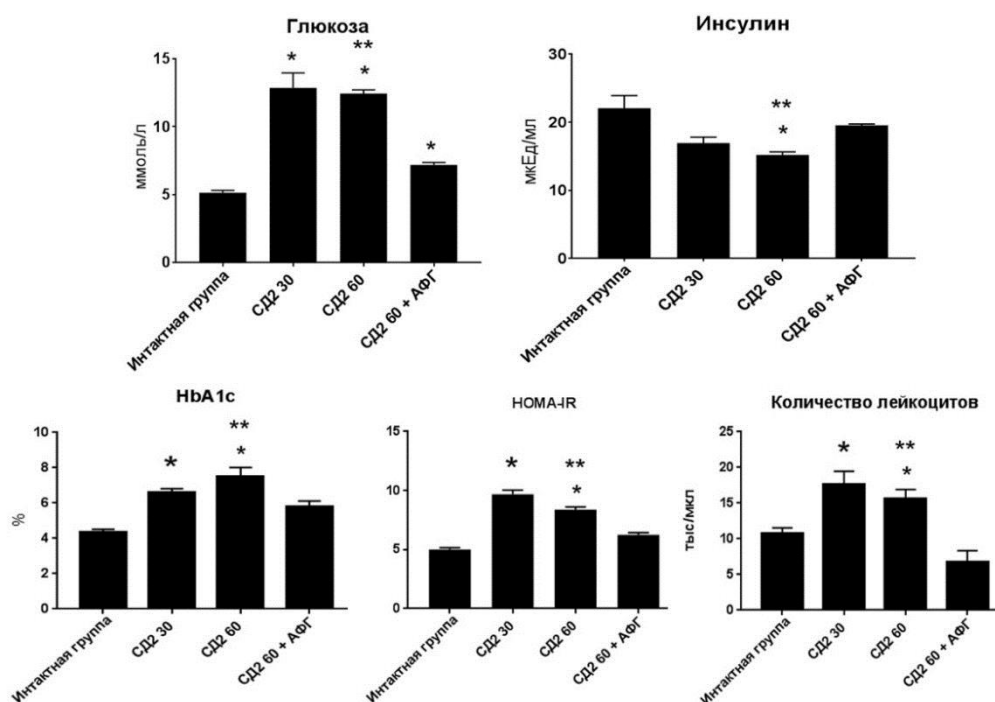
Данные представлены в виде среднего арифметического ( $M$ )  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $m$ ). Статистический анализ данных выполнен в пакетах программ Microsoft Office Excel 2007 и Origin Pro 9.0, графическое представление данных – в GraphPad Prism 7.0. Значимость различий между группами оценивали с помощью непараметрического критерия для сравнения трёх и более независимых групп (критерий Краскела-Уоллиса), выбранный в силу малого объёма выборок и отсутствия нормального распределения. Критический уровень значимости  $p$  при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При развитии экспериментального СД2 в крови крыс были отмечены рост уровня глюкозы и гликированного гемоглобина и снижение концентрации инсулина. Инсулинорезистентность, оцениваемая на основании значения индекса HOMA-IR, увеличилась. Количество лейкоцитов в крови возросло. Таким образом, развилось состояние, характерное для СД2, включающее формирование стойкой умеренной



гипергликемии и резистентности к инсулину и развитие комплекса воспалительных реакций (рисунок 2).



**Рисунок 2 – Показатели периферической крови и состояния углеводного обмена экспериментальных животных,  $M \pm m$**

Примечание: \* –  $p < 0,05$  в сравнении с интактной группой; \*\* –  $p < 0,05$  в сравнении с группой СД2 продолжительностью 60 суток + АФГ; HbA<sub>1c</sub> – гликированный гемоглобин; HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance) – индекс, используемый для оценки инсулинорезистентности; СД2 30 и СД2 60 – сахарный диабет второго типа продолжительностью 30 и 60 суток соответственно; СД2 60 + АФГ – группа животных с сахарным диабетом второго типа продолжительностью 60 суток, которым вводился аминифталгидразид натрия.

В ходе работы было выявлено наличие ИПК в неэндокринной части поджелудочной железы у крыс во всех экспериментальных группах. Установлено, что наблюдаемое у интактных крыс преобладание количества ацинарных ИПК над количеством протоковых ИПК (примерно 80 % / 20 %) сохраняется при развитии СД2 (таблица 1).

Морфометрический анализ показал, что большая часть ИПК как ацинарной, так и протоковой локализации у крыс объединена в группы (таблица 1). Развитие СД2 сопровождалось снижением общего количества внеостровковых ИПК (таблица 1).

У интактных крыс и крыс с экспериментальным СД2 площадь одиночных ацинарных ИПК больше, чем протоковых (таблица 2). При СД2 не было выявлено изменений размеров одиночных протоковых ИПК, площадь одиночных ацинарных ИПК резко возросла к 30 суткам диабета, вернувшись к интактным значениям к 60 суткам.



**Таблица 1 – Количество внеостровковых инсулин-позитивных клеток (ИПК) разной локализации в поджелудочной железе экспериментальных животных, N/mm<sup>2</sup>, M ± m**

Исследуемый параметр	Экспериментальная группа			
	Интактная	Сахарный диабет 2 типа (СД2)		
		30 суток	60 суток	60 суток + АФГ
Общее количество внеостровковых ИПК	3,5 ± 0,54	3,15 ± 0,34	1,81 ± 0,24 <sup>1; 2; 3</sup>	8,65 ± 1,66 <sup>1</sup>
Из них:				
в составе ацинусов / Доля ацинарных ИПК от всех внеостровковых ИПК, %	2,8 ± 0,37 / 81,05 ± 5,02	2,61 ± 0,33 / 82,98 ± 5,39	1,86 ± 0,43 <sup>2</sup> / 78,28 ± 7,86	8,23 ± 1,71 <sup>1</sup> / 76,51 ± 6,89
в эпителии протоков / Доля протоковых ИПК от всех внеостровковых ИПК, %	0,71 ± 0,24 / 18,95 ± 5,02	0,54 ± 0,16 / 17,02 ± 5,39	0,28 ± 0,12 <sup>1; 2</sup> / 21,72 ± 7,86	1,74 ± 0,24 <sup>1</sup> / 23,49 ± 6,89
В том числе:				
одиночные ИПК в составе ацинусов	0,28 ± 0,09	0,78 ± 0,14 <sup>1</sup>	0,28 ± 0,09 <sup>2; 3</sup>	1,94 ± 0,36 <sup>1</sup>
одиночные ИПК в эпителии протоков	0,12 ± 0,05	0,11 ± 0,04	0,17 ± 0,07 <sup>2</sup>	0,52 ± 0,06 <sup>1</sup>
ИПК в составе ацинусов в группах	2,51 ± 0,34	1,83 ± 0,27	1,58 ± 0,42 <sup>2</sup>	6,29 ± 2,05 <sup>1</sup>
ИПК в эпителии протоков в группах	0,59 ± 0,19	0,43 ± 0,15	0,09 ± 0,06 <sup>1; 2</sup>	1,22 ± 0,28 <sup>1</sup>

Примечание: <sup>1</sup> – p < 0,05 в сравнении с интактной группой; <sup>2</sup> – p < 0,05 в сравнении с группой СД2 продолжительностью 60 суток + АФГ; <sup>3</sup> – p < 0,05 в сравнении с группой СД2 продолжительностью 30 суток.

**Таблица 2 – Характеристика внеостровковых инсулин-позитивных клеток (ИПК) поджелудочной железы экспериментальных животных, M ± m**

Исследуемый параметр	Экспериментальная группа			
	Интактная	Сахарный диабет 2 типа (СД2)		
		30 суток	60 суток	60 суток + АФГ
Площадь одиночных ИПК, мкм <sup>2</sup> :				
в составе ацинусов	89,23 ± 12,97 <sup>3</sup>	123,49 ± 13,25 <sup>1; 3</sup>	109,03 ± 24,98 <sup>3</sup>	85,8 ± 5,1 <sup>3</sup>
в эпителии протоков	47,65 ± 7,45	37,2 ± 7,45	47,8 ± 7,31 <sup>2</sup>	68,7 ± 9,7 <sup>1</sup>
Оптическая плотность цитоплазмы ИПК, в условных единицах:				
в составе ацинусов	0,44 ± 0,03	0,42 ± 0,02	0,38 ± 0,03 <sup>1; 2</sup>	0,52 ± 0,05 <sup>1</sup>
в эпителии протоков	0,44 ± 0,03	0,41 ± 0,04	0,43 ± 0,04 <sup>2</sup>	0,63 ± 0,06 <sup>1</sup>

Примечание: <sup>1</sup> – p < 0,05 в сравнении с интактной группой; <sup>2</sup> – p < 0,05 в сравнении с группой СД2 продолжительностью 60 суток + АФГ; <sup>3</sup> – p < 0,05 со значением “средняя площадь протоковой ИПК” внутри одной экспериментальной группы.

Функциональная активность ИПК, оцениваемая по оптической плотности цитоплазмы, уменьшалась по мере развития СД2 в ацинарных ИПК и практически не изменялась в протоковых ИПК. Таким образом, особенности изменения размеров и функциональной активности ИПК при СД2 зависели от их локализации.

При СД2 наблюдалось перераспределение макрофагов в паренхиме неэндокринной части поджелудочной железы (таблица 3), изменение содержания TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  и TGF- $\beta$ 1 в крови и ткани железы (таблица 4), усиление макрофагальной инфильтрации ацинусов на фоне сохранения общего количества макрофагов в неэндокринной части органа. Закономерно увеличение содержания в крови провоспалительных цитокинов TNF- $\alpha$ , связанного с развитием инсулинорезистентности, и IFN- $\gamma$ , отражающего выраженность воспалительных реакций в организме, и снижение содержания цитокина TGF- $\beta$ 1, влияющего на дифференцировку панкреоцитов, в крови и поджелудочной железе.

Известно, что макрофаги оказывают влияние на протекание регенераторных процессов в поджелудочной железе. Проведённое в работе введение крысам с экспериментальным СД2 аминафталгидазида натрия, действие которого на макрофаги описано в литературе, было направлено на снижение выраженности воспалительных процессов в организме, что подтверждается уменьшением общего количества лейкоцитов и IFN- $\gamma$  в крови на фоне увеличения концентрации TGF- $\beta$ 1 (рисунок 1, таблица 4).

**Таблица 3 – Количество макрофагов в неэндокринной части поджелудочной железы экспериментальных животных, N/mm<sup>2</sup>, M  $\pm$  m**

Исследуемый параметр	Экспериментальная группа			
	Интактная	Сахарный диабет 2 типа (СД2)		
		30 суток	60 суток	60 суток + АФГ
Общее количество, штук /мм <sup>2</sup> паренхимы железы	87,45 $\pm$ 6,49	116,52 $\pm$ 12,97	113,07 $\pm$ 11,97 <sup>2</sup>	42,42 $\pm$ 5,33 <sup>1</sup>
Из них:				
в составе ацинусов	26,45 $\pm$ 6,28 <sup>4</sup>	90,3 $\pm$ 17,29 <sup>1;4</sup>	97,97 $\pm$ 18,72 <sup>1;2;4</sup>	16,39 $\pm$ 3,41
в эпителии протоков	61,00 $\pm$ 6,3	26,22 $\pm$ 5,02 <sup>1</sup>	15,1 $\pm$ 6,76 <sup>1;2;3</sup>	26,03 $\pm$ 2,08 <sup>1</sup>
Доля макрофагов от общего количества макрофагов в неэндокринной части железы, %:				
в ацинусах	29,89 $\pm$ 6,97	73,41 $\pm$ 5,46	82,5 $\pm$ 7,83	36,97 $\pm$ 3,71
в эпителии протоков	70,11 $\pm$ 6,97	26,59 $\pm$ 5,46	17,5 $\pm$ 7,83	63,03 $\pm$ 3,71

Примечание: <sup>1</sup> – p < 0,05 в сравнении с интактной группой; <sup>2</sup> – p < 0,05 в сравнении с группой СД2 продолжительностью 60 суток + АФГ; <sup>3</sup> – p < 0,05 в сравнении с группой СД2 продолжительностью 30 суток; <sup>4</sup> – отличия количества макрофагов в ацинусах и протоках внутри группы достоверны (p < 0,05).

Воздействие на крыс с экспериментальным СД2 аминокеталгидразидом натрия (АФГ) привело к снижению общего количества макрофагов в неэндокринной части паренхимы поджелудочной железы более чем в 2,5 раза за счёт уменьшения макрофагальной инфильтрации ацинарной части железы (таблица 3). При этом в ткани железы снизилась концентрация TNF- $\alpha$  и увеличилась концентрация TGF- $\beta$ 1.

Воздействие АФГ привело к увеличению количества и функциональной активности ИПК в обеих исследованных локализациях (таблицы 1–2). При этом сохранялось количественное преобладание ИПК ацинарной локализации над протоковой. Унификация размеров одиночных ИПК разных локализаций, наблюдаемая при воздействии на макрофаги, возможно, происходила в силу увеличенной скорости образования ИПК, а увеличение концентрации инсулина в крови могло быть следствием возросшей функциональной активности внеостровковых ИПК. Полученные в работе данные демонстрируют связь между количеством и функциональной активностью макрофагов и образованием и функционированием внеостровковых ИПК.

**Таблица 4 – Содержание TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  и TGF- $\beta$ 1 в крови и поджелудочной железе экспериментальных животных, пг/мл, М  $\pm$  m**

Цитокин	Экспериментальная группа			
	Интактная	Сахарный диабет 2 типа (СД2)		
		30 суток	60 суток	60 суток + АФГ
В крови				
TNF- $\alpha$	16,14 $\pm$ 2,06	146,9 $\pm$ 34,65 <sup>1</sup>	202,78 $\pm$ 43,18 <sup>1</sup>	167,96 $\pm$ 37,94 <sup>1</sup>
IFN- $\gamma$	133,53 $\pm$ 8,06	755,21 $\pm$ 56,59 <sup>1</sup>	752,69 $\pm$ 103,36 <sup>1;2</sup>	126,02 $\pm$ 3,62
TGF- $\beta$ 1	270,75 $\pm$ 14,21	149,4 $\pm$ 12,39 <sup>1</sup>	126,72 $\pm$ 6,72 <sup>1;2</sup>	186,7 $\pm$ 16,38 <sup>1</sup>
В поджелудочной железе				
TNF- $\alpha$	161,87 $\pm$ 13,09	102,82 $\pm$ 4,09 <sup>1</sup>	147,13 $\pm$ 29,12 <sup>2</sup>	93,07 $\pm$ 28,62 <sup>1</sup>
IFN- $\gamma$	682,42 $\pm$ 58,31	695,36 $\pm$ 34,81	527,63 $\pm$ 76,31	373,17 $\pm$ 134,89
TGF- $\beta$ 1	263,74 $\pm$ 57,57	115,3 $\pm$ 9,25 <sup>1</sup>	127,71 $\pm$ 20,47 <sup>1;2</sup>	183,41 $\pm$ 31,25

Примечание: <sup>1</sup> – p < 0,05 в сравнении с интактной группой; <sup>2</sup> – p < 0,05 в сравнении с группой животных с СД2 продолжительностью 60 суток + АФГ; TNF- $\alpha$  – фактор некроза опухоли альфа; IFN- $\gamma$  – интерферон гамма; TGF- $\beta$ 1 – трансформирующий фактор роста бета 1.

В работе изучались возможные механизмы макрофагальной регуляции образования и функционирования востровковых ИПК. В настоящее время в качестве потенциальных источников образования ИПК вне островков поджелудочной железы называются неэндокринные панкреоциты (ацинарные и протоковые) и стволовые клетки.

Фактор транскрипции Pdx1 определяет образование и функциональную активность инсулин-продуцирующих клеток поджелудочной железы, влияя на процессы трансдифференцировки неэндокринных клеток в эндокринные. При СД2 наблюдалось

снижение количества белка Pdx1 в ацинарных и протоковых клетках железы, что закономерно объясняет снижение количества и функциональной активности внеостровковых ИПК.

Воздействие АФГ, напротив, приводило к увеличению количества Pdx1-содержащих клеток в составе ацинусов и эпителии протоков поджелудочной железы (таблица 5).

**Таблица 5 – Количество Pdx1-позитивных клеток в неэндокринной части поджелудочной железы экспериментальных животных, N/mm<sup>2</sup>, M ± m**

Исследуемый параметр	Экспериментальная группа			
	Интактная	Сахарный диабет 2 типа (СД2)		
		30 суток	60 суток	60 суток + АФГ
В составе ацинусов	34,19 ± 7,59	26,89 ± 3,55 <sup>2</sup>	20,8 ± 3,92 <sup>1;2</sup>	58,73 ± 19,53
В эпителии протоков	20,48 ± 4,11	16,19 ± 3,86 <sup>1;2</sup>	17,24 ± 2,5 <sup>2</sup>	32,00 ± 3,34

Примечание: <sup>1</sup> – p < 0,05 в сравнении с интактной группой; <sup>2</sup> – p < 0,05 в сравнении с группой животных с СД2 продолжительностью 60 суток + АФГ.

Наблюдаемое при СД2 увеличение концентрации фактора стволовой клетки (SCF) в крови и ткани железы не сопровождалось ростом количества c-kit-позитивных клеток, лигандом для которых он является, что сохранялось и при воздействии на функциональную активность макрофагов АФГ (таблица 6).

**Таблица 6 – Концентрация фактора стволовой клетки (SCF) в крови и поджелудочной железе (ПЖ) и количество клеток, экспрессирующих маркер c-kit (c-kit<sup>+</sup> клетки), в неэндокринной части поджелудочной железы (ПЖ) экспериментальных животных**

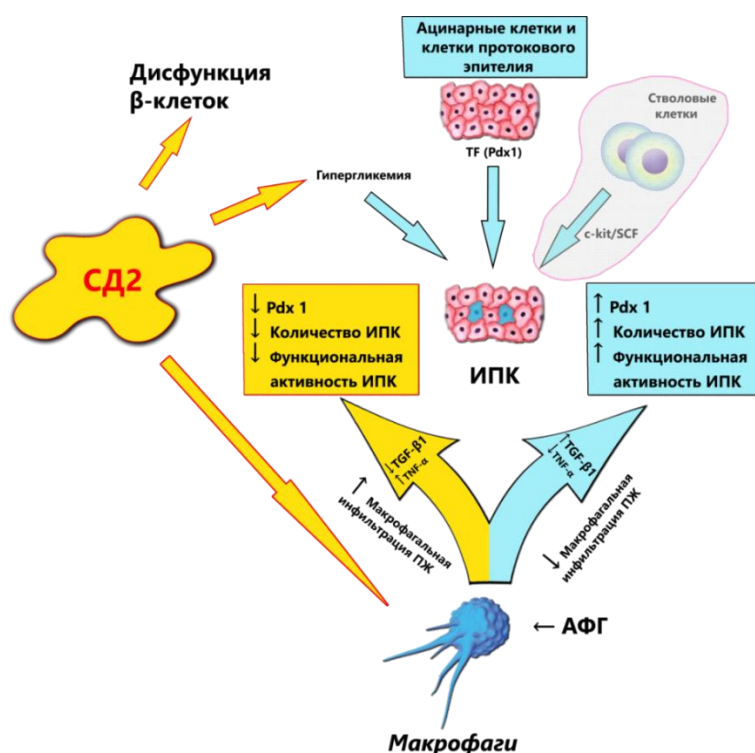
Исследуемый параметр	Экспериментальная группа			
	Интактная	Сахарный диабет 2 типа (СД2)		
		30 суток	60 суток	60 суток + АФГ
Концентрация SCF в крови, пг/мл	95,16 ± 7,13	118,31 ± 3,86 <sup>1;2</sup>	131,54 ± 8,48 <sup>1</sup>	123,61 ± 8,05 <sup>2</sup>
Концентрация SCF в ПЖ, пг/мл	271,32 ± 19,63	627,47 ± 25,32 <sup>1;2</sup>	456,04 ± 40,6 <sup>1</sup>	623,1 ± 24,95 <sup>1;2</sup>
Количество c-kit <sup>+</sup> клеток, N/mm <sup>2</sup>	22,64 ± 4,87	4,13 ± 0,79 <sup>1</sup>	3,31 ± 0,52 <sup>1</sup>	1,2 ± 0,3 <sup>1</sup>

Примечание: <sup>1</sup> – p < 0,05 в сравнении с интактной группой; <sup>2</sup> – p < 0,05 в сравнении с группой СД2 продолжительностью 60 суток.

Выявленные механизмы макрофагальной регуляции образования и функционирования внеостровковых ИПК схематично изображены на рисунке 3.

Образование внеостровковых ИПК в паренхиме поджелудочной железы может происходить под влиянием ряда факторов: содержания транскрипционных факторов, в первую очередь Pdx1, в ацинарных и протоковых клетках железы; рекрутирования

стволовых клеток из костного мозга и их дифференцировки; воздействия гипергликемической среды. Важным фактором образования внеостровковых ИПК является выраженность воспалительного фона в поджелудочной железе, так как известно, что избыточное воспаление тормозит процессы трансдифференцировки в железе. При СД2 было отмечено усиление макрофагальной инфильтрации ацинусов, повышенный воспалительный фон в железе, в частности, снижено содержание ростового фактора TGF $\beta$ 1, вызывающего образование инсулин-продуцирующих клеток и принимающего участие в регулировании баланса экзокринных и эндокринных клеток железы. Также уменьшалось количество ацинарных и протоковых клеток железы, экспрессирующих Pdx1. Описанные изменения обуславливали снижение количества и функциональной активности внеостровковых ИПК в поджелудочной железе при развитии экспериментального СД2.



**Рисунок 3 – Патофизиологические механизмы макрофагальной регуляции образования и функционирования внеостровковых инсулин-позитивных клеток (ИПК) поджелудочной железы**

Примечание: СД2 – сахарный диабет второго типа; TF (Pdx1) – фактор транскрипции Pdx1; ПЖ – поджелудочная железа; TGF- $\beta$ 1 – трансформирующий фактор роста бета 1; TNF- $\alpha$  – фактор некроза опухоли альфа; АФГ – аминокфталгидразид натрия.

Воздействие на макрофаги аминокфталгидразидом натрия привело к снижению выраженности воспалительных реакций в организме и поджелудочной железе, что, в частности, создало благоприятный фон для трансдифференцировки неэндокринных клеток железы в ИПК под влиянием Pdx1. Результатом увеличения количества Pdx1-

позитивных клеток в составе ацинусов и эпителии протоков, снижения уровня воспаления и увеличения содержания TGF- $\beta$ 1 в ткани поджелудочной железы могло стать наблюдаемое увеличение количества и функциональной активности внеостровковых ИПК. В работе не было выявлено влияния активности и продукции макрофагов на дифференцировку внеостровковых ИПК из стволовых клеток-предшественниц, что отражено на рисунке 3 штриховкой соответствующего блока.

## ВЫВОДЫ

1. В норме инсулин-позитивные клетки обнаруживаются в паренхиме поджелудочной железы вне островков Лангерганса в составе ацинусов и в эпителии протоков одиночно и в составе небольших групп, в условиях экспериментального сахарного диабета второго типа их количество снижается; неоднородность реагирования субпопуляций внеостровковых инсулин-позитивных клеток на развитие экспериментального сахарного диабета второго типа проявляется через изменение размеров и функциональной активности клеток.

2. Снижение макрофагальной инфильтрации ацинусов поджелудочной железы, наблюдаемое при воздействии на макрофаги аминофталгидразидом натрия при экспериментальном сахарном диабете второго типа, сопровождается увеличением количества и функциональной активности внеостровковых инсулин-позитивных клеток.

3. Изменение функциональной активности макрофагов у крыс с экспериментальным сахарным диабетом второго типа под действием аминофталгидразида натрия приводит к снижению концентрации IFN- $\gamma$  в крови и TNF- $\alpha$  в ткани поджелудочной железы и росту концентрации TGF- $\beta$ 1 в крови и ткани поджелудочной железы.

4. Функциональная активность макрофагов влияет на количество ацинарных и протоковых клеток поджелудочной железы, экспрессирующих транскрипционный фактор Pdx1.

5. Увеличение концентрации фактора стволовой клетки в ткани поджелудочной железы при воздействии на макрофаги аминофталгидразидом натрия не сопровождается изменением экспрессии рецептора к фактору стволовой клетки (c-kit) ацинарными и протоковыми клетками железы.

6. Влияние макрофагов на активность внеостровковых инсулин-позитивных клеток поджелудочной железы осуществляется посредством изменения содержания в ткани железы провоспалительных цитокинов и ростовых факторов, а также изменения количества ацинарных и протоковых клеток поджелудочной железы, экспрессирующих фактор транскрипции Pdx1.



## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При изучении инсулинопродуцирующей системы организма необходимо учитывать присутствие инсулинопродуцентов в паренхиме поджелудочной железы вне островков Лангерганса как в физиологически нормальных условиях, так и при патологии (сахарный диабет второго типа).

2. При разработке новых способов профилактики и бета-клеточной заместительной терапии сахарного диабета второго типа (СД2) необходимо учитывать зависимость образования и активности инсулин-позитивных и Pdx1-позитивных внеостровковых клеток поджелудочной железы от количества макрофагов, инфильтрирующих неэндокринную часть поджелудочной железы, и их функциональной активности, а также неоднородность реагирования инсулин-позитивных клеток ацинарной и протоковой субпопуляций на развитие СД2.

3. Учитывая положительный эффект на образование и активность внеостровковых инсулин-позитивных клеток поджелудочной железы, выявленный в эксперименте, аминофталгидразид натрия может быть использован при разработке новых способов профилактики и терапии СД2.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю признательность специалистам, чей вклад способствовал работе над диссертацией: доктору медицинских наук, профессору М.Т. Абидову, предоставившему аминофталгидразид натрия и принимавшему участие в обсуждении и интерпретации результатов исследования, и старшему научному сотруднику ИИФ УрО РАН, кандидату биологических наук И.Ф. Гетте, совместно с которой осуществлялось моделирование сахарного диабета второго типа и определение биохимических показателей крови экспериментальных животных.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

*Публикации в научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для опубликования результатов диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук и/или индексируемые в международных базах цитирования Scopus, Web of Science, RSCI и PubMed:*

1. Инсулин-позитивные клетки печени и экзокринной части поджелудочной железы у животных с экспериментальным сахарным диабетом / М.Б. Байкенова, В.А. Черешнев, К.В. Соколова, И.Ф. Гетте, В.В. Емельянов, И.Г. Данилова // Бюллетень сибирской медицины. – 2020. – № 19 (4). – С. 6-13. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-6-13>. (В Перечне ВАК по специальности «патологическая физиология»; IF Scopus – 0,11; Web of Science; РИНЦ).

2. Mechanisms of macrophages effect on extra-islet insulin-positive cells in experimental diabetes / K. Sokolova, M. Baykenova, I. Gette, I. Danilova, M. Abidov // Virchows Archiv. – 2020. – 477 (Suppl 1): S 208-209. PS-25-022. (IF Web of Science – 2,754).

3. Sokolova, K. Pdx1 Gene Production and Extra-Islet Insulin-Positive Cells in Experimental Type 2 Diabetes and after Injections of Sodium Aminophthalhydrazide in Rats / K. Sokolova, M. Baykenova, M. Abidov // Proceedings – 2020 Ural Symposium on Biomedical Engineering, Radioelectronics and Information Technology, USBEREIT 2020 / IEEE Xplore, 2020. – P. 113-116. (**Scopus**).

4. Соколова, К.В. Проявление регенераторного потенциала внеостровковых инсулин-синтезирующих клеток поджелудочной железы в условиях экспериментального диабета 2 типа и при введении аминопфталгида / К.В. Соколова, В.В. Емельянов, И.Ф. Гетте, М.Т. Абидов // Российский иммунологический журнал. – 2019. – Т. 13 (22), № 2. – С. 930-932. (**PubMed**; ИФ РИНЦ – 0,67).

5. Macrophage Cytokine Production and Regeneration of Pancreas at Experimental Diabetes / K. Sokolova, I. Danilova, A. Belousova, I. Gette, M. Abidov // Proceedings – 2019 Ural Symposium on Biomedical Engineering, Radioelectronics and Information Technology, USBEREIT 2019. – 2019. – Article № 8736671. – P. 118-119. (**Scopus**).

6. Булавинцева, Т.С. Особенности развития компенсаторных процессов в инсулинсинтезирующей системе при аллоксановом диабете / Т.С. Булавинцева, Б.Г. Юшков, К.В. Соколова, И.Г. Данилова // Российский физиологический журнал имени И. М. Сеченова. – 2018. – Т. 104, № 11. – С. 1291-1300. (в базе данных **RSCI**; ИФ РИНЦ – 0,64).

7. Влияние модуляции активности макрофагов на состояние инсулиноцитов при моделировании сахарного диабета 2 типа / В.А. Черешнев, А.В. Белоусова, К.В. Соколова, И.Г. Данилова, И.Ф. Гетте // Российский иммунологический журнал. – 2018. – Т. 12, № 4. – С. 782-784. (**PubMed**; ИФ РИНЦ – 0,67).

8. Влияние модуляции макрофагов на состояние внеостровковой инсулин-продуцирующей системы при гипергликемии / К.В. Соколова, А. В.Белоусова, И.Ф. Гетте, И.Г. Данилова, М.Т. Абидов // Российский иммунологический журнал. – 2018. – Т. 12 (21), № 3. – С. 439-443. (**PubMed**; ИФ РИНЦ – 0,67).

9. Реакция островковых и внеостровковых эндокриноцитов при моделировании сахарного диабета 1 и 2 типа / А.В. Белоусова, К.В. Соколова, И.Ф. Гетте, С.Ю. Медведева, И.Г. Данилова, В.А. Черешнев // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2018. – Т. 15, № 3. – С. 405-412. (В Перечне **ВАК по специальности «патологическая физиология»**; ИФ РИНЦ – 0,156).

10. Цитокиновая регуляция регенераторных процессов в поджелудочной железе при аллоксановом сахарном диабете у крыс и его коррекции соединением 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. (В Перечне **ВАК**; **Scopus**; ИФ РИНЦ – 0,735).

11. 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. – 473 (Suppl 1):S 68-69. – PS-03-018. (IF **Web of Science** – 2,754).

12. New approaches to the correction of metabolic disorders in experimental diabetes mellitus / V. Emelianov, I. Danilova, I. Gette, K. Sokolova, L. Sidorova, T. Tseitler // Proceedings – 2018 Ural Symposium on Biomedical Engineering, Radioelectronics and Information Technology, USBEREIT 2018. – 2018. – P. 111-112. (**Scopus**).

13. Sokolova, K. Extra-islet insulin-producing cells in experimental diabetes mellitus and at modulation activity of macrophages / K. Sokolova, I. Gette, I. Danilova, M. Abidov // Virchows Archiv. – 2018. – 473 (Suppl 1): S 68. – PS-03-015. (IF **Web of Science** – 2,754).

**Публикации в других изданиях:**

14. Sokolova, K. Insulin-producing system in experimental diabetes mellitus and at modulation activity of macrophages / K. Sokolova, I. Danilova, I. Gette, M. Abidov // Endocrinology & Diabetes Research. – 2018. – Vol. 4. – P. 44.

15. Соколова, К.В. Повреждения инсулин-продуцирующей системы при экспериментальном сахарном диабете / К.В. Соколова, А.В. Белоусова, Т.С. Булавинцева // X Всероссийский конгресс молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2017»: сб. тез. (Казань, 25 – 28 окт. 2017 г.). – Казань, 2017. – С. 258-259.

**Список основных используемых сокращений**

АФГ	натриевая соль 5-амино-2,3-дигидрофталазин-1,4-диона
ИПК	инсулин-позитивные клетки
Мкм	микрометр
ммоль/л	миллимоль на литр
мМЕ/мл	милли- международная единица на миллилитр
ПЖ	поджелудочная железа
СД	сахарный диабет
СД2	сахарный диабет второго типа
У.е.	условные единицы
IFN- $\gamma$ (interferon gamma)	интерферон гамма
IL	интерлейкины
LYM (lymphocytes)	лимфоциты
$M \pm m$	среднее арифметическое $\pm$ ошибка среднего
$N/mm^2$	штук на $mm^2$ паренхимы органа
c-kit	рецептор фактора роста тучных и стволовых клеток
Pdx1 (pancreatic and duodenal homeobox 1)	панкреатический дуоденальный гомеобоксный белок 1
SCF (stem cell factor)	фактор стволовой клетки
TGF- $\beta$ 1 (transforming growth factor beta 1)	трансформирующий фактор роста бета 1
TNF- $\alpha$ (tumor necrosis factor alpha)	фактор некроза опухоли альфа
$\beta$ -клетки	бета-клетки островков Лангерганса поджелудочной железы

**СОКОЛОВА КСЕНИЯ ВИКТОРОВНА**

**ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ МАКРОФАГАЛЬНОЙ РЕГУЛЯЦИИ  
ОБРАЗОВАНИЯ ВНЕОСТРОВКОВЫХ ИНСУЛИН-ПОЗИТИВНЫХ КЛЕТОК  
ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ  
ДИАБЕТЕ ВТОРОГО ТИПА**

14.03.03 – патологическая физиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук