

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Уральский федеральный университет имени первого Президента России
Б.Н. Ельцина»

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт иммунологии и физиологии
Уральского отделения Российской академии наук

УДК: 616-092

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

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание учёной степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

Данилова Ирина Георгиевна,
доктор биологических наук, доцент

Екатеринбург – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

	С.
ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1 – Влияние макрофагов на внеостровковые инсулин- позитивные клетки поджелудочной железы (обзор литературы)	18
1.1 – Внеостровковые инсулин-позитивные клетки поджелудочной железы	19
1.1.1 – Поджелудочная железа: морфологическая и гистологическая характеристика органа	19
1.1.2 – Морфологическая и функциональная связь островков Лангерганса с ацинусами и протоками поджелудочной железы	21
1.1.3 – Пластичность клеток поджелудочной железы	25
1.1.4 – Внепанкреатические инсулин-продуцирующие клетки	27
1.2 – Особенности регенерации поджелудочной железы	29
1.2.1 – Транскрипционные факторы Pdx1, MafA, Neurogenin 3 и их влияние на образование инсулин-продуцирующих клеток поджелудочной железы	32
1.2.2 – Роль стволовых клеток и фактора стволовой клетки в регенерации поджелудочной железы	35
1.3 – Макрофаги в норме и при сахарном диабете второго типа	38
1.3.1 – Общая характеристика макрофагов	38
1.3.2 – Влияние макрофагов на патогенез и течение сахарного диабета второго типа	40
1.3.2.1– Макрофаги в поджелудочной железе при сахарном диабете второго типа	42
1.4 – Роль цитокинов в патогенезе сахарного диабета второго типа и в регенерации поджелудочной железы	44
1.4.1 – Роль TNF- α в патогенезе сахарного диабета второго типа и в регенерации поджелудочной железы	44
1.4.2 – Роль IFN- γ в патогенезе сахарного диабета второго типа и в регенерации поджелудочной железы	46
1.4.3 – Участие TGF- β 1 в патогенезе сахарного диабета второго типа и в процессах развития клеток	48
1.5 – Влияние макрофагов на регенерацию	50

ГЛАВА 2 – Материалы и методы, используемые в работе	54
2.1 – Общая характеристика экспериментальных животных	54
2.2 – Моделирование сахарного диабета второго типа	54
2.2.1 – Экспериментальные модели диабета	55
2.2.2 – Адаптация и верификация модели сахарного диабета второго типа	58
2.3 – Метод воздействия на функциональную активность макрофагов	64
2.4 – Описание экспериментальных групп	66
2.5 – Исследование содержания глюкозы и гликированного гемоглобина в крови	67
2.6 – Исследование содержания количества лейкоцитов в крови	68
2.7 – Иммуноферментные методы исследования	68
2.7.1 – Исследование крови экспериментальных животных методом иммуноферментного анализа	68
2.7.2 – Исследование поджелудочной железы экспериментальных животных методом иммуноферментного анализа	70
2.8 – Иммуногистохимическое исследование поджелудочной железы экспериментальных животных	71
2.8.1 – Анализ срезов поджелудочной железы, окрашенных с применением антител к инсулину	74
2.8.2 – Выявление макрофагов в поджелудочной железе	74
2.8.3 – Анализ срезов поджелудочной железы, окрашенных с применением антител к Pdx1	75
2.8.4 – Анализ срезов поджелудочной железы, окрашенных с применением антител к c-kit	75
2.9 – Статистические методы, использованные в работе для обработки экспериментального материала	75
ГЛАВА 3 – Внеостровковые инсулин-позитивные клетки поджелудочной железы при экспериментальном сахарном диабете второго типа	77
3.1 – Внеостровковые инсулин-позитивные клетки в поджелудочной железе интактных крыс	77

3.1.1 –	Морфологическая характеристика и оценка функциональной активности внеостровковых инсулин-позитивных клеток поджелудочной железе intactных крыс	80
3.2 –	Внеостровковые инсулин-позитивные клетки в поджелудочной железе крыс при экспериментальном сахарном диабете второго типа	81
3.2.1 –	Оценка биохимических показателей крови крыс при развитии экспериментального сахарного диабета второго типа	82
3.2.2 –	Содержание внеостровковых инсулин-позитивных клеток в поджелудочной железе крыс при развитии экспериментального сахарного диабета второго типа	84
3.2.3 –	Морфологическая характеристика и оценка функциональной активности внеостровковых инсулин-позитивных клеток поджелудочной железы крыс при развитии экспериментального сахарного диабета второго типа	85
	Резюме	86
	Список статей, опубликованных по материалам главы 3	88
	ГЛАВА 4 – Макрофаги в неэндокринной части поджелудочной железы при экспериментальном сахарном диабете второго типа и при воздействии аминоталгидразидом натрия	90
4.1 –	Макрофаги в неэндокринной части поджелудочной железы	90
4.1.1 –	Оценка содержания макрофагов в неэндокринной части поджелудочной железы intactных крыс и крыс с экспериментальным сахарным диабетом второго типа	90
4.1.2 –	Оценка содержания макрофагов в неэндокринной части поджелудочной железы крыс при воздействии аминоталгидразидом натрия	92
4.2 –	Исследование функциональной активности макрофагов	93
4.2.1 –	Оценка функциональной активности макрофагов в крови и в поджелудочной железе intactных крыс и крыс с экспериментальным сахарным диабетом второго типа	93
4.2.2 –	Оценка функциональной активности макрофагов в поджелудочной железе и в крови при воздействии аминоталгидразидом натрия	95
	Резюме	96
	Список статей, опубликованных по материалам главы 4	97

ГЛАВА 5 – Внеостровковые инсулин-позитивные клетки поджелудочной железы при изменении активности макрофагов аминокетогидразидом натрия	99
5.1 – Содержание внеостровковых инсулин-позитивных клеток различных локализаций при изменении активности макрофагов	99
5.2 – Оценка размеров и функциональной активности внеостровковых инсулин-позитивных клеток поджелудочной железы при изменении активности макрофагов	100
5.3 – Оценка биохимических показателей крови при изменении активности макрофагов	101
Резюме	102
Список статей, опубликованных по материалам главы 5	103
ГЛАВА 6 – Механизмы макрофагальной регуляции образования и функционирования внеостровковых инсулин-позитивных клеток поджелудочной железы	105
6.1 – Оценка содержания транскрипционного фактора Pdx1 в неэндокринной части поджелудочной железы	105
6.1.1 – Содержание транскрипционного фактора Pdx1 в неэндокринной части поджелудочной железы интактных крыс и крыс с экспериментальным сахарным диабетом второго типа	106
6.1.2 – Содержание транскрипционного фактора Pdx1 в неэндокринной части поджелудочной железы крыс при изменении активности макрофагов	107
6.2 – Оценка содержания фактора стволовой клетки в крови и поджелудочной железе	108
6.2.1 – Содержание фактора стволовой клетки в крови и поджелудочной железе крыс с экспериментальным сахарным диабетом второго типа	108
6.2.2 – Содержание фактора стволовой клетки в крови и поджелудочной железе крыс при изменении активности макрофагов	109
6.3 – Оценка количества c-kit-позитивных клеток в неэндокринной части поджелудочной железы	110
6.3.1 – Оценка количества c-kit-позитивных клеток в неэндокринной части поджелудочной железы крыс с экспериментальным сахарным диабетом второго типа	111

6.3.2 – Оценка количества c-kit-позитивных клеток в неэндокринной части поджелудочной железы при изменении активности макрофагов	111
Резюме	111
Список статей, опубликованных по материалам главы 6	113
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	114
ВЫВОДЫ	124
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	126
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	127
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	128

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень её разработанности.

Сахарный диабет второго типа (СД2) – прогрессирующее метаболическое заболевание, характеризующееся хронической гипергликемией, возникающей вследствие нарушения секреции инсулина на фоне развития инсулинорезистентности [293, 294]. 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 (β -клеток) островков Лангерганса поджелудочной железы, что приводит к нарастанию гипергликемии и прогрессированию диабета [4, 9]. Дисфункция β -клеток, по-видимому, занимает крайне важное место в патогенезе СД2, что нашло отражение в сформулированной в 2016 году β -клеточно-ориентированной модели развития СД2 [278], согласно которой прогрессирующее снижение массы и функционального резерва β -клеток является одним из основных патогенетических механизмов развития СД2. В последнее время исследователи приходят к заключению, что дисфункция β -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 [65, 131, 166, 252]. В литературе отмечено сниженное по сравнению с β -клетками количество GLUT2 рецепторов на мембране внеостровковых ИПК [65] и их меньшая уязвимость по сравнению с β -клетками островков в условиях аллоксанового СД [5]. В ряде работ продемонстрирована нормализация гипергликемии при СД на фоне увеличения количества внеостровковых ИПК [164, 169]. 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 β -клетками [145, 188] и наличия общих для всех клеток поджелудочной железы транскрипционных факторов, определяющих их дифференцировку и созревание [98, 234].

Факты, подтверждающие пластичность клеток поджелудочной железы в постнатальном периоде, широко описаны в литературе [234]. 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 [208, 303]. Основная роль в развитии поджелудочной железы в эмбриональном и постнатальном периоде принадлежит Pdx1 [212, 304], 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 β -клетках [245]. У взрослых животных активность гена *pdx1* снижается в экзокринной части железы и выражена только в зрелых β -клетках [147].

Вопрос образования ИПК из плюрипотентных стволовых клеток [187, 254] 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 [14]. Ранее на моделях повреждения печени и почек было показано, что вещества, синтезируемые макрофагами, могут способствовать выходу стволовых клеток из костного мозга и их миграции к повреждённому органу, что может способствовать репарационным процессам в тканях [14, 16].

Механизмы и условия, способствующие образованию внеостровковых ИПК, до конца неизвестны. 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 [75, 113]. Между тем, показано, что репрограммирование экзокринных клеток поджелудочной железы в инсулин-продуцирующие возможно лишь при ограничении выработки макрофагами провоспалительных цитокинов [221]. Во-вторых, доказано, что макрофаги способствуют рекрутированию стволовых клеток и их миграции в повреждённые органы [14, 47], а также сами способны вырабатывать SCF [250]. В-третьих, доказано влияние активности макрофагов на пролиферацию β -клеток островков Лангерганса [80, 124, 173, 224].

Наличие доказательств участия макрофагов в образовании инсулин-продуцирующих клеток ставит вопрос о конкретных механизмах их влияния на внеостровковые 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 β -клеток. При СД2 IFN- γ , действуя совместно с другими цитокинами, в частности, с TNF- α ,

индуцирует апоптоз β -клеток островков Лангерганса [142]. TNF- α является провоспалительным цитокином, повышенная секреция которого усугубляет развитие инсулинорезистентности при СД2 [9, 59]. Макрофаги высвобождают TNF- α в условиях воспаления и в постпрандиальный период. TNF- α действует на β -клетки, изменяя выработку и секрецию инсулина [101]. Напротив, TGF- β 1 способствует пролиферации β -клеток, он высвобождается макрофагами в островках Лангерганса при снижении количества β -клеток. Представители семейства TGF- β могут модулировать развитие поджелудочной железы, участвуя в регуляции количественного баланса эндокринных и экзокринных клеток железы. Моноциты и макрофаги являются основными источниками белков TGF- β [25]. Предполагают, что макрофаги могут использовать TGF- β 1 как сигнальную молекулу, способствующую пролиферации β -клеток и регенерации поджелудочной железы [92, 101]. Показано, что совместное действие лиганда TGF- β активина и ретиноевой кислоты регулирует развитие эпителия поджелудочной железы [180]. На более поздних этапах эмбрионального развития белки TGF- β выступают в качестве сигнальных молекул, влияющих на то, будет ли клетка дифференцироваться в экзо- или эндокринную [234, 267].

Таким образом, предположение о том, 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 [1, 30, 176, 195].

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 аминофталгидразида натрия, способствует увеличению количества Pdx1-позитивных клеток в паренхиме неэндокринной части железы и сопровождается ростом содержания TGF- β 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 о том, что при развитии СД2 количество как ацинарных, так и протоковых ИПК снижается, несмотря на выраженную макрофагальную инфильтрацию органа. Воздействие на макрофаги амнофталгидразидом 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- β 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- α и IFN- γ и снижением концентрации TGF- β 1 в ткани железы.

3. Уменьшение макрофагальной инфильтрации ацинусов поджелудочной железы, снижение концентрации TNF- α и увеличение продукции TGF- β 1 в ткани железы под действием амнофталгидразида 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 объёма современной научной литературы по исследуемому вопросу, что обосновывает направление исследования. Выбор адекватных поставленным

задачам методов исследования, достаточный объём 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 (USBREIT)) (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 РНФ № 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.

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.

ГЛАВА 1 – ВЛИЯНИЕ МАКРОФАГОВ НА ВНЕОСТРОВКОВЫЕ ИНСУЛИН-ПОЗИТИВНЫЕ КЛЕТКИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (обзор литературы)

Сахарный диабет второго типа (СД2) – неоднородная с точки зрения этиологии и патогенеза группа заболеваний (метаболических нарушений), характеризующаяся относительной инсулиновой недостаточностью и инсулинорезистентностью [2, 8, 9]. Развивающаяся вследствие этого гипергликемия ведёт к таким осложнениям, как нефропатия, ретинопатия, нейропатия, энтеропатия. В отличие от диабета первого типа (СД1), аутоиммунного заболевания, манифестирующего чаще всего в детстве и молодом возрасте, начало СД2 связано в большей степени с перееданием и гиподинамией, хотя большую роль в патогенезе СД2 играют, по-видимому, мультифакторные наследственные предрасположенности [9]. Если при СД1 разрушение β -клеток происходит за счёт собственных цитотоксических Т-клеток, то при СД2 снижение выработки инсулина β -клетками происходит постепенно, как попытка компенсировать развивающуюся инсулинорезистентность. Значение функционального состояния инсулин-продуцирующих клеток для гомеостаза глюкозы, бесспорно, очень высоко, что нашло отражение в сформулированной в 2016 году группой исследователей во главе со Стенли Шварцем β -клеточно-ориентированной модели патогенеза СД2, согласно которой основополагающим условием манифестации СД2 является именно дисфункция β -клеток [278].

СД2 широко распространен по всему миру и является одной из актуальных проблем современной медицины. Нарастающий при прогрессировании СД2 дефицит инсулина требует поиска путей восполнения его недостатка.

1.1 – Внеостровковые инсулин-позитивные клетки поджелудочной железы

Гормон поджелудочной железы инсулин (от лат. *insula* – островок), играющий решающую роль в регуляции углеводного обмена, синтезируется специализированными клетками и секретируется в кровь в ответ на повышение уровня глюкозы. Большая часть инсулин-продуцирующих клеток расположена в особых гистологических образованиях, отделённых от экзокринной части железы соединительно-тканной оболочкой – островках Лангерганса. Наряду с β -клетками островков, продукцию инсулина в поджелудочной железе осуществляют сравнительно немногочисленные инсулин-позитивные клетки, расположенные в ацинусах и в эпителии протоков [48, 91, 163, 166, 222]. Внеостровковые инсулин-продуцирующие клетки поджелудочной железы привлекают к себе внимание исследователей, поскольку стимуляция их образования и функционирования является перспективной терапевтической стратегией в лечении диабета.

1.1.1 – Поджелудочная железа: морфологическая и гистологическая характеристика органа

Поджелудочная железа – орган в забрюшинном пространстве, участвующий в регуляции пищеварения, а также углеводного и липидного обменов. Поджелудочная железа совмещает внешнесекреторную и внутрисекреторную функции и имеет в своём составе как экзокринные, так и эндокринные клетки.

Внешнесекреторная функция железы заключается в секреции панкреатического сока, принимающего участие в расщеплении питательных веществ. Структурно-функциональной единицей экзокринной части поджелудочной железы является ацинус. В составе ацинусов выделяют

секреторный отдел и вставочный проток. Секреторный отдел состоит, по данным разных авторов, от 8–12 до 25–50 плотно прилежащих друг к другу и образующий «шарик» ацинозных клеток (экзокринных панкреоцитов) [3, 6]. Ацинозные клетки имеют коническую форму, их широкие основания обращены наружу ацинуса и лежат на общей базальной мембране, а заострённые верхушки сходятся в центре ацинуса. Между верхушками ацинозных клеток расположено несколько мелких центроацинозных протоковых эпителиоцитов.

Экзокринные панкреоциты секретируют и выделяют в полость ацинуса секреты белковой природы. На 98 % секрет состоит из ферментов, остальное – вода и электролиты. Синтез ферментов происходит постоянно, а их выход из ацинарных клеток – спонтанно за счет базального холинэргического тонуса, но основное количество секрета выделяется в результате стимуляции [21]. Ацинарные клетки синтезируют и секретируют α -амилазу, принимающую участие в переваривании крахмала, липолитические и протеолитические ферменты и нуклеазы для гидролиза нуклеотидов. Все протеолитические ферменты выделяются клетками в виде функционально неактивных предшественников, что защищает ткань поджелудочной железы от самопереваривания [3, 21]. Секретируемые ферменты попадают в систему протоков поджелудочной железы, через которую панкреатический сок поступает в полость двенадцатиперстной кишки.

Эндокринная часть поджелудочной железы представлена в виде островков Лангерганса и отдельных эндокринных клеток (внеостровковых эндокриноцитов) и их небольших скоплений [3, 222]. Ещё в 1911 году было показано наличие отдельных эндокринных клеток в паренхиме экзокринной части железы и эпителиальной выстилке протоков у морских свинок [67].

Островки располагаются между ацинусами и в большинстве случаев отделены от них тонкой базальной мембраной и едва различимой соединительно-тканной прослойкой. В ряде случаев базальная мембрана вокруг островка может отсутствовать, а между эндокринными и экзокринными клетками имеются десмосомы, плотные или щелевидные контакты [3]. Это

позволяет предположить, что клетки ацинусов и островков связаны между собой структурно и функционально. По данным разных авторов, в поджелудочной железе здоровой взрослой крысы насчитывается от 400 до 5000 островков [202, 273].

По способности синтезировать и секретировать тот или иной гормон эндокриноциты поджелудочной железы подразделяются на α -клетки (α -клетки, секретируют глюкагон), бета-клетки (β -клетки, инсулин), δ -клетки (δ -клетки, соматостатин), PP-клетки (панкреатический полипептид) и эпсилон-клетки (ϵ -клетки, грелин). Согласно морфометрическим исследованиям у млекопитающих α -клетки составляют 15–20 % от всех клеток островка, β -клетки – от 65 до 80 %, δ -клетки – от 3 до 10 %, PP-клетки – от 3 до 10 % и ϵ -клетки – менее 1% [186]. У крыс на долю эндокринной ткани приходится около 2 % ткани железы [284], половину которой составляют β -клетки [180]. У крыс и кроликов β -клетки крупнее других клеток в островке [257, 284] и занимают его центральную часть [217]. Эндокринная ткань островков составляет менее 5 % от всей ткани поджелудочной железы, что у людей составляет более 1000000 клеток [302].

1.1.2 – Морфологическая и функциональная связь островков Лангерганса с ацинусами и протоками поджелудочной железы

К настоящему времени накоплено множество данных, подтверждающих структурную и функциональную взаимосвязь как между островками и экзокринной частью железы, так и между её эндокринной тканью и системой протоков [3, 69, 143]. Влияние эндокринных клеток на ацинарные формирует островково-ацинарную ось. Предполагают, что её морфологической базой является особенность кровотока в поджелудочной железе, так называемая инсулоацинарная портальная система [3, 143, 282]. Кровоток в поджелудочной железе направлен от островков к ацинарной ткани, благодаря чему, кровь, оттекающая от островков и содержащая гормоны в высоких концентрациях,

попадает в капиллярную сеть экзокринной части железы. Установлено, что гормоны, секретируемые клетками панкреатических островков, могут регулировать секрецию ацинарных клеток как эндокринным, так и паракринным способами. Предположения о том, что интенсивность синтеза ферментов экзокринными клетками ацинарной части поджелудочной железы находится в зависимости от количества инсулина в капиллярах, покидающих островки, высказывались уже давно [143, 253]. В исследованиях последних лет отмечается положительная корреляция между высоким уровнем амилазы в сыворотке крови и высокой чувствительностью к инсулину, а также отмечается низкий уровень амилазы в крови у пациентов с ожирением и нарушениями метаболизма [56]. При недостатке выработки инсулина при диабете первого типа развивается дисфункция поджелудочной железы, проявляющаяся снижением выработки амилазы, трипсина, липазы и бикарбонатов [132].

Существование ациноостровковых клеток также свидетельствует о наличии тесной морфо-функциональной связи между экзокринной и эндокринной частями поджелудочной железы. Подобные немногочисленные клетки способны одновременно синтезировать и пищеварительные ферменты, и гормоны. Они были обнаружены у представителей всех классов животных, начиная с костистых рыб, в том числе и у человека [48]. Ациноостровковые клетки совмещают черты строения экзокринных и эндокринных клеток: в них хорошо развит комплекс Гольджи, они содержат крупные и мелкие гранулы и митохондрии (первые свойственны экзокринным, вторые – эндокринным клеткам), гранулярная эндоплазматическая сеть по степени развитости занимает промежуточное положение между экзокринными и эндокринными клетками. Ациноостровковые клетки могут содержать гранулы, свойственные α -, β -, δ -клеткам, а также их сочетание. Помимо основанной на этом классификации по гормональному профилю, ациноостровковые клетки можно подразделить по месту выделения секреторного продукта на экзокринные (выделяют ферменты и гормоны в систему протоков железы) и эндокринные (секретируют свои продукты в кровь).

Если взаимодействие между ацинусами и островками общепризнанно и доказывается существованием анатомических и функциональных связей между ними, то вопрос отношений между эндокринной частью поджелудочной железы и системой протоков более дискуссионен. Структурная связь между островками и протоками ранее рассматривалась как временное следствие эмбрионального развития ткани поджелудочной железы. Однако исследования последних лет демонстрируют сохранение тесных отношений между эндокринной тканью и протоками во взрослой железе.

На поджелудочной железе взрослых крыс показано, что четыре основных типа панкреатических эндокринных клеток могут располагаться одиночно в составе эпителия протоков [70]. При этом апикальный полюс большинства протоковых эндокриноцитов ориентирован в просвет протока. Показано, что у нормогликемических животных локализация эндокринных клеток в составе эпителия протоков отличается в зависимости от типа секретируемого ими гормона, в частности, инсулин-секретирующие клетки распределены равномерно вдоль всего протока [223]. У животных с диабетом количество инсулин-синтезирующих клеток снижается в малых протоках железы в два раза и практически сходит на нет в общем желчном протоке. В ряде экспериментальных ситуаций показано увеличение количества отдельных эндокринных клеток в эпителии протоков. Так, перевязка протока поджелудочной железы индуцировала экспрессию специфического для β -клеток транспортера глюкозы GLUT2 [289], а регенерация ткани железы при избирательном уничтожении β -клеток аллоксаном происходила за счёт дифференцированных от протоков единичных внеостровковых инсулин-синтезирующих клеток [100].

Поджелудочная железа людей по понятным причинам изучена хуже, чем у крыс, но у них также установлено наличие внеостровковых инсулин-синтезирующих клеток [3, 78, 91, 131, 163]. Интересно, что количество протоковых инсулин-продуцирующих клеток у человека выше, чем у крысы: если у крыс оно равно примерно 1 % [288], то, по данным Bouwens L. и

Pipeleers D.G., у человека до 15 % от всех инсулин-секретирующих клеток располагаются в эпителии протоков [78]. Отмечено, что размер протоковых инсулин-продуцирующих клеток меньше, чем β -клеток островков [78, 288].

В поджелудочной железе взрослых крыс показано наличие также групп эндокринных клеток, связанных со вставочными и внутридольковыми протоками. Эти группы, один конец которых выступает за пределы протока, а другой плотно примыкает к эпителиальным клеткам протоков и образует с ними развитые межклеточные контакты, содержат до 25 преимущественно инсулин-секретирующих клеток (небольшое количество глюкагон- и соматостатин-секретирующих клеток присутствует лишь в некоторых группах).

В ходе исследования функциональных и морфологических отношений между экзокринной и эндокринной частями поджелудочной железы выяснилось, что $73,60 \pm 2,97$ % островков Лангерганса связаны с протоками железы, причём, $93,48 \pm 5,43$ % из них связаны с протоками небольшого размера или центроациназными клетками [70].

Известно, что основные гормоны островков присутствуют в панкреатическом соке [70, 93], назначение которых там пока не ясно. Высказывалось предположение, что инсулин, входящий в состав сока поджелудочной железы, может всасываться кишечным эпителием, несущим на своей щеточной кайме рецепторы к инсулину [123]. Исследования, выполненные с помощью электронного микроскопа, позволяют предположить поглощение инсулина из панкреатического сока клетками самих протоков [70]. Неизвестно, является ли данное явление одним из механизмов реабсорбции гормона и возвращения его в кровоток или он используется непосредственно протоковыми клетками.

Исследование микроархитектоники сосудистой сети поджелудочной железы показало, что протоки снабжаются кровью, оттекающей от островков и, следовательно, несущей гормоны в высокой концентрации [215]. Следовательно, секреторная активность эндокриноцитов в эпителии протоков

находится под влиянием островков. Bertelli E. и Benda M. [69] высказываются об эндокриноцитах в протоках как о втором эндокринном компартменте поджелудочной железы, расположенном «ниже по течению» от основного компартмента – островков Лангерганса. Островково-протоковые порталные системы и их функционирование, безусловно, нуждаются в дальнейшем исследовании.

Таким образом, уникальность поджелудочной железы как секреторного органа состоит в том, что, будучи морфологически обособленными и функционально самостоятельными, экзокринные и эндокринные элементы перемешаны в паренхиме железы [222] и между ними существует взаимодействие как на уровне анатомии, так и на уровне функций [3, 69]. Предполагают, что отдельные компоненты органа взаимозаменяемы, а морфологическим субстратом эндокринно-экзокринно-дуктальной оси являются, в частности, система капилляров поджелудочной железы и ультраструктурные особенности ациноостровковых клеток.

1.1.3 – Пластичность клеток поджелудочной железы

В настоящее время всё большее количество исследователей опровергают представление о клетках поджелудочной железы, как о терминально дифференцированных, и демонстрируют факультативную дедифференцировку клеток в ответ на стресс. Beamish C.A. et al. [65] сообщают о наличии в поджелудочной железе инсулин-позитивных клеток с малым количеством рецепторов GLUT2, проявляющих свойства клеточной пластичности. Культуры β -клеток, взятых как из цельной поджелудочной железы, так и из отдельных островков семидневных мышей, обрабатывали человеческой плацентарной щелочной фосфатазой (human placental alkaline phosphatase – НРАР), после чего часть клеток начала экспрессировать НРАР. НРАР⁺ β -клетки теряли способность синтезировать инсулин, но увеличивали экспрессию маркера эпителиальных протоковых клеток цитокератина 19 (Ck19). В

культурах из цельной поджелудочной железы наблюдалось большее число $\text{NRP}^+\text{Ck19}^+$ клеток, из чего авторы сделали вывод, что дедифференцировки подверглись, в основном, инсулин-продуцирующие клетки, расположенные вне островков. Такие клетки составляют около 3,5 % от всех инсулин-синтезирующих клеток, располагаются группами не более 5 штук и имеют малое количество рецепторов GLUT2 ($\text{GLUT2}^{\text{LOW}}$). Показано, что данные $\text{инсулин}^+ \text{GLUT2}^{\text{LOW}}$ клетки демонстрируют более высокую скорость пролиферации *in vivo* и *in vitro* и значительную пластичность по сравнению с $\text{инсулин}^+ \text{GLUT2}^+$ клетками, будучи способны трансформироваться в эндокринные и протоковые клетки даже во взрослой жизни. ПЦР исследования показали, что $\text{инсулин}^+ \text{GLUT2}^{\text{LOW}}$ клетки имеют фенотип незрелых β -клеток. Авторы исследования резюмируют, что группы внеостровковых инсулин-продуцирующих клеток представляет собой резидентную популяцию, способную образовывать новые функционально полноценные β -клетки, в связи с чем, представляют интерес для регенеративной медицины.

В литературе сообщается о возможности превращения в инсулин-продуцирующие всех типов клеток поджелудочной железы: ацинарных, протоковых и не-бета клеток островков Лангерганса [167, 169]. В частности, Tritschler S. et al. в обзоре, посвящённом исследованию гетерогенности и пластичности клеток поджелудочной железы, также называет запуск эндогенной репарации многообещающей стратегией восстановления количества β -клеток и нормогликемии у пациентов с диабетом [282]. В работе обсуждаются как возможность воздействия на субпопуляции β -клеток, стимулирующие их пролиферацию и созревание, так и пластичность клеток поджелудочной железы и возможности их трансдифференцировки в инсулин-синтезирующие в ситуациях, требующих усиления гликемического контроля. Подвергнуться трансдифференцировке и начать производить инсулин могут α - и δ -клетки островков, внеостровковые клетки ацинарной и протоковой локализации, а также гепатоциты и кишечные клетки. Valdez I.A. et al. показали образование ИПК в клеточных линиях протокового эпителия поджелудочной

железы человека в ответ на введение провоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-1 β и IFN- γ) [232].

Обе классические формы сахарного диабета характеризуются неспособностью β -клеток островков Лангерганса удовлетворять потребности организма в инсулине или в силу их тотальной гибели, происходящей при диабете первого типа, или функционального дефицита β -клеток в условиях инсулинорезистентности при диабете второго типа. И то, и другое требует поиска новых путей восстановления массы инсулин-синтезирующих клеток. Присущая клеткам поджелудочной железы пластичность делает возможным перепрограммирование уже дифференцированных клеток железы в эндокринные, в частности, в инсулин-синтезирующие [234]. Показано присутствие клеток, дающих позитивное иммуногистохимическое окрашивание на инсулин, в составе ацинусов и в эпителии протоков поджелудочной железы крыс с экспериментальным диабетом первого и второго типов [5, 32, 204, 252].

1.1.4 – Внепанкреатические инсулин-продуцирующие клетки

Теоретически, поскольку все клетки организма несут одинаковый набор генов, то, влияя на экспрессию гена, ответственного за синтез конкретного вида белка, можно добиться синтеза данного вида белка клеткой. Однако гипотетически возможный синтез клеткой любого белка ограничен сложностью запуска экспрессии генов. В настоящее время накоплена масса свидетельств того, что поджелудочная железа не является единственным источником инсулина в организме. Таким образом, потенциал внеостровковой секреции инсулина может быть существенно расширен за счёт внепанкреатических инсулин-продуцирующих клеток.

В настоящее время известно, что роль инсулина в организме не сводится только к регуляции углеводного обмена. Роль инсулина в метаболических и патологических процессах крайне разнообразна, а течение почти всех опасных

для жизни болезней усугубляется его недостатком [258]. Показано, что изменение метаболизма углеводов влечёт за собой развитие многих опасных заболеваний, таких как гипертония и атеросклероз [76, 209]. На важную роль инсулина в физиологических процессах указывает и его присутствие в организмах наиболее простых и эволюционно древних представителей царства Animalia [160, 284].

Описана секреция инсулина клетками разных типов в разных органах: печени [162, 168, 270], тимусе [125], селезёнке [125], желудочно-кишечном тракте [104], головном мозге и нейронах [146, 159, 161], жировой ткани [125], костном мозге [125] лейкоцитах [162, 258] и лимфоцитах [258].

Предполагают, что экспрессия инсулина в тимусе и лимфоидной ткани происходит с целью индукции иммунологической толерантности к инсулину [88, 158, 249]. Высказываются предположения о нарушении экспрессии определённых аллелей гена инсулина как о возможном механизме патогенеза аутоиммунного диабета первого типа у людей [158].

При развитии гипергликемии в экспериментальных моделях диабета и при ожирении отмечено появление проинсулин- и инсулин-положительных клеток в печени [162, 168, 270], головном мозге, жировой ткани, желудочно-кишечном тракте, костном мозге, тимусе и лейкоцитах [13, 125]. Так, в исследованиях Kojima H. et al. [125], гипергликемия, вызванная инъекциями глюкозы, приводила к появлению инсулин-позитивных клеток у мышей без диабета в течение двух дней, причём, авторы данного исследования подчёркивают, что проведённая *in situ* гибридизация ядер показала, что инсулин был синтезирован именно в этих клетках. Авторы пишут о возможности регуляции экспрессии гена инсулина как о возможной стратегии генерации инсулин-продуцирующих клеток для лечения диабета.

Таким образом, в норме небольшое количество инсулин-продуцирующих клеток локализовано вне островков поджелудочной железы. При повышении уровня глюкозы в крови их количество в поджелудочной железе возрастает, а также появляются отдельные инсулин-позитивные клетки вне поджелудочной

железы. Так, Petit J.M. et al. рассматривают синтез гепатоцитами инсулина как одно из свидетельств развития диабета [241].

Предполагают, что внеостровковая и внепанкреатическая секреция развились для обеспечения локальных потребностей клеток в инсулине [258]. Это можно продемонстрировать на следующем примере: инсулин, являясь антитромбическим фактором, препятствует развитию острого коронарного синдрома. Тромбоциты, будучи безъядерными, сами неспособны синтезировать инсулин, следовательно, эту функцию при развитии СД2 и повышении риска развития атеросклероза берут на себя другие клетки в кровотоке [162, 258].

1.2 – Особенности регенерации поджелудочной железы

Исследования регенерации поджелудочной железы во взрослом состоянии ведутся давно, однако, до сих пор в этом вопросе нет полной ясности. Между тем, широкая распространённость диабета делает его крайне актуальным. Утрата и повреждение количества β -клеток требует терапевтического вмешательства. Известно, что способность поджелудочной железы человека, в том числе островков Лангерганса, к регенерации, ограничена [302]. Однако в настоящее время накоплено множество доказательств того, что восстановление ткани железы может происходить даже у взрослых животных, и дискуссия разворачивается по поводу того, как оно происходит. В обзорной статье в журнале Nature, посвященной регенерации поджелудочной железы, Zhou Q. и Melton D.A. в качестве ведущих стратегий восстановления массы β -клеток называют создание и трансплантацию новых β -клеток, полученных из плюрипотентных стволовых клеток, пересадку островков от генетически-модифицированных животных, стимуляцию пролиферации островковых β -клеток и перепрограммирование не- β -клеток в β -подобные клетки [302].

Пересадка поджелудочной железы или её части сопряжена с рядом трудностей [229]. Развитие осложнений и смертность при трансплантации поджелудочной железы выше, чем при трансплантации других органов [181]. Трансплантация отдельно островков поджелудочной железы возможна лишь пациентам с сохранённой функцией почек [181], а именно она нарушается при диабете. Таким образом, пересадка островков возможна далеко не всем пациентам. В связи с этим, большое внимание исследователей привлекают эндогенные источники регенерации ткани поджелудочной железы, к которым относят трансдифференцировку не- β -клеток поджелудочной железы и активацию собственных стволовых клеток в ответ на повреждение.

Исследования на животных показали, что экзокринная часть поджелудочной железы обладает внутренней способностью к регенерации. Рассуждая о регенерации пула инсулин-синтезирующих клеток путём образования из клеточных предшественников в поджелудочной железе, необходимо выяснить природу этих предшественников. Традиционно исследователями разрабатывались два подхода: первый – регенерация происходит за счёт клеток-предшественников, локализованных в протоках, второй сводил регенерацию поджелудочной железы лишь к делению её зрелых клеток [106, 302].

В 80-х годах XX века были получены доказательства гистологической связи островков с протоками поджелудочной железы [261], что породило идею о возобновлении эндокринных клеток поджелудочной железы из предшественниц, локализованных в эпителии протоков. Это идея подкреплялась наблюдениями того, что островки Лангерганса мышей и человека локализованы преимущественно вблизи протоков железы [291]. Во многих исследованиях показана дифференцировка клеток протоков в эндокринные при культивировании или стимуляции [85, 120, 246]. Эти представления оформились в гипотезу, согласно которой регенерация поджелудочной железы во взрослом состоянии повторяет стадии эмбрионального развития органа, т.е. клетки-предшественницы в протоках

делятся и дифференцируются в любой тип клеток поджелудочной железы [244]. Однако вопрос о возможности дифференцировки клеток протокового эпителия в инсулин-синтезирующие остаётся дискуссионным. Например, в 2004 году эта возможность была поставлена под сомнение по результатам исследования, полученным путём отслеживания клеточных линий, демонстрирующих, что большинство β -клеток в постнатальном периоде образовались в результате пролиферации уже существующих β -клеток, а не из сторонних клеточных предшественников [108].

Работы последних лет демонстрируют возможность использования пластичности дифференцированных клеток поджелудочной железы в терапевтических целях. Множество исследований, проведённых *in vitro* и *vivo*, раскрывают потенциал дифференцировки экзокринных и эндокринных клеток поджелудочной железы в инсулин-продуцирующие клетки. Так, на клетках человека показана дифференцировка экзокринных клеток поджелудочной железы в инсулин-секретирующие *in vitro* [53, 119] на грызунах показано превращение ацинарных клеток поджелудочной железы в инсулин-секретирующие под действием цитокинов [140, 279] и повторная дедифференцировка специализированных клеток железы *in vivo* [238].

В настоящее время существуют как доказательства динамической пластичности и факультативной дедифференцировки клеток поджелудочной железы, так и того, что эпителий протоков содержит пул стволовых клеток, являющихся предшественниками для всех видов клеток железы [106, 274]. Возможно, эти представления можно объединить в единую модель, предполагающую вовлечение разных механизмов регенерации. в зависимости от выраженности повреждения. Вероятно, регенерация поджелудочной железы происходит как вследствие репликации существующих дифференцированных клеток, так и активации и дифференцировки клеток-предшественников в ответ на обширное повреждение. Так, показано, что абляция транскрипционного фактора FoxO1, интегрирующего сигналы, регулирующие массу β -клеток [269], вызывает уменьшение количества β -клеток в условиях физиологического

стресса, вызванного старением или многоплодной беременностью не в силу их гибели, а путём дедифференцировки в клетки-предшественники, экспрессирующие Neurogenin3, Oct4 и Nanog [265]. На настоящий момент не выяснено, являются ли прогениторные клетки остаточными после эмбрионального периода или они возникают в результате дедифференцировки клетки эпителия протоков в ответ на стресс. Однако в таком случае не ясно, почему они обнаруживаются в поджелудочной железе здоровых грызунов и людей.

1.2.1 – Транскрипционные факторы Pdx1, MafA, Neurogenin 3 и их влияние на образование инсулин-продуцирующих клеток поджелудочной железы

Экспрессия гена инсулина и его секреция β -клетками островков Лангерганса регулируется уровнем глюкозы в крови. Таким образом, если целью дифференцировки клеток в инсулин-продуцирующие является не только получение инсулин-позитивных клеток, но и адекватная секреция ими инсулина в ответ на физиологические стимулы, основным из которых является уровень глюкозы в крови, то в них должен быть активирован комплекс генов, свойственный β -клеткам островков Лангерганса. Поэтому при образовании инсулин-продуцирующих клеток из неэндокринных клеток поджелудочной железы и клеток других органов, способных к подобной трансформации, очень важно воспроизвести в них экспрессию тех же самых генов, которые активируются в β -клетках островков Лангерганса в ходе их нормального развития.

Транскрипционные факторы регулируют экспрессию генов посредством связывания со специфическими энхансерными последовательностями [303]. Наиболее важными для развития и созревания панкреоцитов, в частности, β -клеток, являются гомеобоксный протеин поджелудочной железы и

двенадцатиперстной кишки (Pdx1), Neurogenin-3 (Ngn3), MafA, Pax6, NeuroD [133, 208, 303]. Предполагают, что совместная работа отвечающих за синтез данных белков генов активирует гены, отвечающих за синтез инсулина, однако вклад каждого из них в синтез инсулина известен не до конца.

Pdx1 – белок, продукт экспрессии гена *pdx1* (pancreatic and duodenal homeobox 1). Pdx1 является ключевым транскрипционным фактором, необходимым для развития поджелудочной железы, начиная с ранних этапов эмбрионального развития, в том числе основным регулятором созревания, сохранения и функционирования β -клеток островков Лангерганса. Экспрессия Pdx1 значительно возрастает в клетках островков и протоков при репаративной регенерации [271]. Регуляция транскрипции Pdx1 влияет на эндокринный неогенез *in vivo* и *in vitro* [304]. Показано, что введение Pdx1 в эмбриональные стволовые клетки и мультипотентные клетки перепрограммирует их в инсулин-продуцирующие [41]. Недостаток Pdx1 в эпителиальных клетках панкреатических зачатков приостанавливает их дальнейшее развитие [198], а полное отсутствие Pdx1 ассоциировано с агенезией поджелудочной железы [175]. Сниженное количество Pdx1 приводит к дисфункции β -клеток, их гибели и развитию диабета, что было показано на грызунах и на людях [99, 152, 196, 256]. В экспериментах на животных показано, что нарушение регуляции экспрессии гена *pdx1* в β -клетках может лежать в основе патогенеза СД2 [290], а при СД1 белок Pdx1 является специфическим аутоантигеном β -клеток [220]. Хроническая гипергликемия и дислипидемия приводят к деструкции β -клеток при СД2 посредством редукции экспрессии *pdx1* [230].

Предполагают, что гибель инсулин-продуцирующих клеток в животных моделях диабета наступает, в основном, за счёт апоптоза [79]. Апоптоз β -клеток приводит к ингибированию передачи сигнала между инсулином и инсулин-подобным фактором роста с последующим снижением экспрессии *pdx1* [843].

Полагают, что в процессе развития поджелудочной железы, по мере дифференцировки β -клеток, количество Pdx1 в них увеличивается, а в экзокринных клетках и клетках протоков снижается [237]. Экспрессия гена *pdx1*

поддерживается в клетках-предшественницах клеток поджелудочной железы во время развития органа, а во взрослой поджелудочной железе в зрелых β -клетках белок Pdx1 трансктивирует инсулин и другие гены, работа которых позволяет детектировать уровень глюкозы, а также генов, задействованных в её метаболизме, такие, как GLUT2 и глюкокиназа [153].

Известно, что Pdx1 индуцирует образование инсулин-продуцирующих клеток из не-бета клеток [124, 303].

Поскольку Ngn3 считают ключевым фактором образования эндокринных клеток поджелудочной железы во время эмбриогенеза, то многие исследователи не исключают влияния экспрессии Ngn3 на неогенез β -клеток во взрослом состоянии. Показано, что введением Ngn3 методом аденовирусной трансдукции в клетки протоков поджелудочной железы можно *in vitro* запустить в них экспрессию набора генов, характерного для β -клеток [228]. Однако другая группа исследователей пишет о недостаточности активации Ngn3 в протоковых клетках для получения из них β -клеток. Их данные противоречат распространённому представлению об Ngn3 как о маркере неогенеза β -клеток во взрослом состоянии [207].

Роль MafA в образовании инсулин-продуцирующих клеток дискутируется. Не ясно, активирует ли он экспрессию гена инсулина в дифференцирующихся β -клетках или необходим лишь для регуляции секреции инсулина в уже дифференцированных клетках панкреатических островков. Калигин М.С. с соавторами показали [31], что MafA синтезируется лишь в зрелых клетках островков Лангерганса и не является маркером дифференцирующихся клеток-предшественниц. Согласно их исследованиям количество MafA⁺ клеток в островках Лангерганса снижается при диабете. В свою очередь, Kaneto H. et al. говорят о MafA как о факторе транскрипции, специфичном для β -клеток, который является мощным активатором транскрипции гена инсулина [225]. В литературе подчёркивается важная роль MafA в индукции ИПК из не-бета клеток [225, 303].

Показана тесная связь между экспрессией генов *pdx1*, *ngn3* и генов, кодирующих инсулин, при дифференциации мезенхимальных стволовых клеток в инсулин-продуцирующие, которая проявляется в сходном типе реагирования на увеличение уровня глюкозы в крови. При повышении содержания глюкозы количество Pdx1 возрастает, следствием чего становится увеличение экспрессии Ngn3 и других факторов, совместное действие которых приводит к формированию клеток, подобных β -клеткам посредством активации гена инсулина и других. Колебание количества Pdx1 и Ngn3 приводит к нестабильному выделению инсулина ИПК [124].

Сообщается, что эффективность образования инсулин-продуцирующих β -подобных клеток из экзокринных клеток поджелудочной железы вследствие сверхэкспрессии Pdx1, Ngn3 и MafA повышается в случае предотвращения фосфорилирования белка Ngn3. Также известно, что под влиянием данных транскрипционных факторов β -подобные клетки можно получить из клеток разных органов желудочно-кишечного тракта *in vivo* [208]. Чувствительность разных типов клеток к подобному перепрограммированию обусловлена общностью их происхождения из энтодермы первичной кишки.

1.2.2 – Роль стволовых клеток и фактора стволовой клетки в регенерации поджелудочной железы

Возможность контролируемой дифференцировки стволовых клеток взрослого организма в инсулин-продуцирующие вызывает большой интерес. Исследования на мышах и людях показывают, что при длительном культивировании клеток панкреатических протоков в них появляются функционирующие эндокринные клетки [167, 240]. Это даёт основания предполагать, что стволовые клетки локализованы в поджелудочной железе вблизи протоков или непосредственно в них.

Стволовые клетки в костном мозге мобилизируются и дифференцируются при стимуляции определёнными сигналами. Макрофаги

способны инициировать выход стволовых клеток и их миграцию к повреждённому органу, что способствует его восстановлению. В индуцированных клетках костного мозга матричная металлопротеиназа-9 (ММР-9) высвобождает фактор стволовой клетки (SCF), что переводит эндотелиальные и гемопоэтические клетки в пролиферативную фазу. Повреждение костного мозга усиливает экспрессию ММР-9, что вызывает выделение SCF и рекрутирование стволовых клеток-предшественников, экспрессирующих на своей поверхности рецептор c-kit [239]. SCF/c-kit связывание приводит к активации сигнального пути, который контролирует пролиферацию, апоптоз и дифференцировку клеток [81, 115]. Однако увеличение экспрессии c-kit не имеет однозначной положительной трактовки, поскольку повышенная в силу мутации или избыточной экспрессии рецепторов активность c-kit наблюдается при онкологических заболеваниях [277].

Показано, что стимуляция функционального состояния макрофагов тормозит выход гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) в циркуляцию при повреждении почек и повышает при повреждениях печени, а ингибирование активности макрофагов тормозит выход ГСК из костного мозга при повреждении обоих органов [14].

Некоторые исследователи относят трансмембранный рецептор белка тирозинкиназы c-kit к маркерам предшественников эндокринных клеток поджелудочной железы [29, 110, 155]. Предполагают, что в определённый период развития, клетки эпителия протоков начинают экспрессировать на своей мембране c-kit рецептор, который, взаимодействуя с SCF, запускает процесс дифференцировки протоковых клеток в эндокринные. После начала синтеза в клетках гормонов они отделяются от протоков и формируют островки. При этом часть прогениторных клеток, способных дать начало эндокриноцитам, остаётся в составе эпителия протоков.

Wu Y. et al. исследовали роль c-kit и SCF в дифференцировке и пролиферации инсулин- и глюкагон-продуцирующих клеток поджелудочной железы. Их исследования показали, что при увеличении количества инсулин-

позитивных и глюкагон-позитивных клеток и содержания транскрипционного фактора Pdx1 наблюдается снижение числа панкреоцитов, экспрессирующих c-kit. При культивировании панкреоцитов с SCF дифференцировка в инсулин-позитивные и глюкагон-позитивные клетки возрастает [90].

Воспалительные процессы в тканях активируют иммуномодулирующий потенциал мезенхимальных стволовых клеток. В основе этого лежат секретируемые макрофагами воспалительные и противовоспалительные цитокины, в частности, TNF- α и IL-10 [150]. Показано, что наличие хронического воспалительного заболевания (периодонта) у больных с СД2 ассоциировано с более высоким уровнем SCF [177]. Накоплены данные, свидетельствующие о том, что мезенхимальные стволовые клетки (МСК) способствуют регенерации ткани не путём замены повреждённых клеток, а через секрецию ростовых факторов и модулирование иммунного ответа. Выделяемые ими простагландины и IL-6 сдвигают продукцию макрофагов в сторону противовоспалительной [68]. Таким образом, в ответ на выделяемые макрофагами провоспалительные цитокины МСК продуцирует вещества, регулирующие иммунный ответ и заставляющие макрофаги секретировать ростовые факторы и противовоспалительные цитокины, приводящие к регенерации и восстановлению тканей. Известно, что на ранних стадиях развития воспалительной реакции макрофаги могут синтезировать одновременно про- и противовоспалительные цитокины. Предполагают, что МСК регулирует переход макрофагов от одного типа активации к другому, однако к настоящему моменту не описаны взаимодействия секретируемых ими факторов.

Широко исследуется и потенциал стволовых клеток для получения инсулин-продуцирующих клеток *in vitro*. Внедрение определённых комбинаций транскрипционных факторов в соматические клетки приводит к их репрограммированию в, так называемые, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC), обладающие способностью к делению и дифференциации в разные типы клеток. Внедряя в эмбриональные клетки и

фибробласты взрослой мыши факторы Oct3/4, Sox2, c-Мус и Klf4, т.е. специфические для эмбриональных стволовых клеток, можно получить iPSC [178]. В дальнейшем, используя протоколы дифференциации, из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток были получены клетки, напоминающие нейроны и кардиомиоциты [299]. Разработка протоколов для получения клеток разных типов, в том числе инсулин-синтезирующих клеток поджелудочной железы, требуют детального знания регуляции развития конкретного органа или ткани.

1.3 – Макрофаги в норме и при сахарном диабете второго типа

Макрофаги – клетки соединительной ткани, обладающие активной подвижностью и выраженной способностью к фагоцитозу. Ведя происхождение от амебоцитов беспозвоночных и подвижных клеток кишечнополостных, филогенетически они являются наиболее древними элементами соединительной ткани и иммунной системы млекопитающих. Термин «макрофаг» был введён Мечниковым в 80-х годах XIX века, он же указал на их связь с моноцитами крови.

1.3.1 – Общая характеристика макрофагов

Циркулирующие в крови моноциты и органо- и тканеспецифичные макрофаги, а также их костномозговые предшественники образуют систему фагоцитирующих мононуклеаров, гетерогенную клеточную популяцию, объединённую общим происхождением. Моноциты – крупные одноядерные лейкоциты из группы агранулоцитов диаметром 18–20 мкм, имеют бобовидное ядро и большое количество цитоплазмы с множеством лизосом, образуются в костном мозге. При делении недифференцированной гемопоэтической стволовой клетки в костном мозге образуются колониеобразующие единицы (КОЕ), которые под влиянием колониестимулирующих факторов и ряда

интерлейкинов (IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6) дают начало гранулоцитам, моноцитам или мегакариоцитам. При дифференцировке по моноцитарному пути из КОЕ-ГМ образуются монобласты, которые пролиферируют и превращаются в промоноциты, а в дальнейшем – в зрелые моноциты. После выхода из костного мозга в кровь моноциты находятся в циркуляции несколько суток, в течение которых продолжают развиваться, после чего проникают в ткани, где превращаются в зрелые тканевые (резидентные) макрофаги. Трансформация моноцитов в макрофаги сопровождается увеличением шероховатости наружной мембраны клетки, что повышает её адгезивные свойства, увеличением количества лизосом и митохондрий и развитием аппарата Гольджи. На мембране появляются многочисленные рецепторы, используемые в ходе межклеточных взаимодействий, восприятия молекулярных сигналов, адгезии, эндо- и фагоцитоза [28]. Трансформация моноцитов в тканевые макрофаги происходит под влиянием микроокружения, которое определяет конечное состояние макрофагов и адаптирует их к условиям органа или ткани. В очаге воспаления макрофаги могут размножаться делением.

Помимо иммунологических, макрофаги выполняют широкий спектр неиммунологических функций. Макрофаги обнаруживаются во всех тканях позвоночных [138] и поддерживают гомеостаз путём реагирования на сигналы об изменениях в организме изменением цитокиновой продукции. Цитокины представляют собой небольшие растворимые пептиды, которые обеспечивают межклеточную коммуникацию и координацию, в частности, взаимодействие между клетками иммунной системы и неиммунными клетками. На основании продуцируемого спектра цитокинов и других медиаторов макрофаги подразделяют на классически активированные, или M1 макрофаги, способствующие воспалению, и противовоспалительные альтернативно активированные, или M2.

Иммунный ответ опосредуется последовательной и координированной работой макрофагов, успешный исход которой состоит в удалении патогена,

устранении воспаления и восстановлении повреждённой ткани. При повреждении ткани резидентные макрофаги высвобождают воспалительные цитокины и хемокины и рекрутируют эффекторные клетки, такие, как нейтрофилы. Непосредственно в месте повреждения макрофаги усиливают экспрессию генов, чья функция связана со снижением воспаления в тканях [190].

Резидентные тканевые макрофаги индуцируют тканеспецифичность метаболических реакций, позволяющих инициировать ранний ответ на инфекцию. Макрофаги могут как вызвать воспаление в ткани, так и погасить его.

1.3.2 – Влияние макрофагов на патогенез и течение сахарного диабета второго типа

Традиционно диабет подразделяют на диабет первого (СД1) и второго (СД2) типов. При СД1 наблюдается абсолютный недостаток инсулина, причиной которого является разрушение β -клеток в результате аутоиммунных реакций [114]. 90–95 % случаев диабета приходятся на СД2, который развивается вследствие развития инсулинорезистентности и относительной недостаточности инсулина [255]. Резистентность к инсулину компенсируется гиперсекрецией инсулина в β -клетках, что приводит к их истощению и снижению функции. Хроническая гипергликемия приводит к сосудистым нарушениям, результатом которых является дисфункция почек, сетчатки глаза, сердечно-сосудистой и нервной систем [170].

Патогенез и осложнения СД2 тесно связаны с рядом факторов: нарушением метаболизма глюкозы, ожирением, сердечно-сосудистыми заболеваниями, неспособностью иммунной системы давать эффективный ответ некоторым патогенным организмам. Однако, наиболее важным фактором патогенеза СД2 является хроническое воспаление. Воспалительные процессы

являются наиболее общими и основными патогенетическими механизмами при развитии диабета [216, 251, 275].

Тканевые резидентные макрофаги являются ключевыми регуляторами воспалительных процессов в тканях [87]. Хроническая гипергликемия приводит к активации активных форм кислорода и развитию окислительного стресса, увеличению количества оксида азота, увеличению количества макрофагов в тканях и секреции ими провоспалительных цитокинов [183]. Дисбаланс цитокиновой секреции лежит в основе развития многих патологических состояний, от хронического воспаления до аллергии [111]. Патогенез обоих типов диабета связан с изменением продукции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов макрофагами [86, 89, 156]. Показана связь между риском развития СД2 и увеличением уровня провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-6, TNF- α) [38, 44, 117]. Хроническое воспаление, вызываемое продуцируемыми макрофагами цитокинами и хемокинами, приводит к развитию резистентности к инсулину в тканях и дисфункции β -клеток поджелудочной железы. Ожирение ведёт к дисбалансу провоспалительных макрофагов M1 и противовоспалительных M2 [214]. Тот факт, что реальная картина поляризации макрофагов, по-видимому, отличается от бинарной M1/M2 системы [182], не отрицает роль провоспалительных макрофагов в патогенезе СД2. Gupta S. et al. сообщают, что в их исследовании уровни провоспалительных цитокинов в сыворотке у пациентов с СД2 не изменяются, но существует разница в степени экспрессии генов, связанных с развитием воспаления в зависимости от уровня глюкозы в крови пациентов и выраженности у них осложнений диабета [60]. Хроническое воспаление и дисбаланс между провоспалительными и противовоспалительными цитокинами ведёт к развитию СД2 [205]. Подавление воспаления может рассматриваться как многообещающий подход к лечению инсулинорезистентности и СД2 [218].

При СД1 воспаление развивается в β -клетках островков Лангерганса поджелудочной железы (инсулит), в развитии которого наряду с Т- и В-клетками большую роль отводят макрофагам. Макрофаги инициируют и

регулируют аутоиммунную агрессию против β -клеток, презентуя их антигены в лимфатических узлах, тем самым активируя цитотоксические Т-лимфоциты. Резидентные макрофаги поджелудочной железы секретируют провоспалительные цитокины, способствующие развитию инсулита. Показано, что нарушения механизмов иммунологической толерантности приводит к появлению аутореактивных Т-клеток у диабетических мышей без ожирения [62]. Прогрессирование СД1 приводит к изменению профиля В-клеток ($CD20^+$), который связан с миграцией $CD8^+$ Т-клеток в панкреатические островки [61, 73]. Макрофаги являются основными медиаторами воспаления в островках посредством секреции цитокинов интерлейкина 1β (IL- 1β) и фактора некроза опухоли альфа (TNF- α), а также продуцируя активные формы кислорода [61, 281].

Интересно, что, хотя при СД2 макрофаги характеризуются повышенной продукцией провоспалительных цитокинов [266, 274], пациенты с диабетом в большей степени подвержены бактериальным заболеваниям [292]. Культивированием клеток в среде с нормальным и повышенным уровнем глюкозы было показано, что долгосрочное повышенное содержание глюкозы в среде увеличивает чувствительность макрофагов к стимуляции цитокинами и снижает фагоцитоз и выработку оксида азота [257].

1.3.2.1 – Макрофаги в поджелудочной железе при сахарном диабете второго типа

Повышенный уровень глюкозы, усиление процессов гликирования, окисление липопротеинов низкой плотности, имеющие место при диабете второго типа, приводят к увеличению количества макрофагов в тканях, вызываемое индукцией хемокинов и молекул адгезии, а также к активации макрофагов. Макрофаги опосредуют повреждение тканей при диабете посредством продукции активных форм кислорода, цитокинов и протеаз. Таким образом, именно макрофаги вносят существенный вклад в развитие

таких осложнений диабета, как нефропатии, атеросклероза, нейропатии и ретинопатии [266].

Известно, что при СД2 в островках поджелудочной железы развивается воспалительный процесс, сопровождающийся инфильтрацией островка макрофагами, цитокинами, апоптозными клетками, активацией ядерного фактора NF- κ B, отложениями амилоида и, в конечном итоге, приводящий к фиброзу [154]. В условиях гипергликемической среды и повышенного содержания неэтерифицированных жирных кислот островки поджелудочной железы продуцируют воспалительные факторы, которые привлекают в островки макрофаги [154]. Повышение количества макрофагов в поджелудочной железе отмечается у животных во всех моделях диабета. В клетках островков Лангерганса при диабете повышается экспрессия интерлейкина 1 β (IL-1 β), который, видимо, является основным регулятором воспалительного процесса в островках при СД2 [107, 112, 113].

Предполагают, что инфильтрация островков макрофагами может благотворно сказываться на их функции [74, 154, 172], но по мере прогрессирования диабета активность макрофагов может изменяться [151] и они могут способствовать дисфункции и гибели клеток. Показано, что макрофаги могут поддерживать секрецию инсулина β -клетками при диабете [172].

В вопросе о влиянии воспаления на образование инсулин-продуцирующих клеток нет однозначности. Например, опубликованы данные, указывающие на то, что воздействие воспалительных цитокинов активирует перепрограммирование клеток эпителия протоков поджелудочной железы в инсулин-продуцирующие вне зависимости от гипергликемического стресса [232].

1.4 – Роль цитокинов в патогенезе сахарного диабета второго типа и в регенерации поджелудочной железы

Цитокины вырабатываются активированными клетками иммунной системы, они лишены специфичности в отношении антигенов и являются медиаторами межклеточных взаимодействий при иммунном ответе, воспалении, гемопоэзе и межсистемных взаимодействиях [15]. В настоящее время изучению роли цитокинов в патогенезе СД2 уделяется большое внимание. Продуцируемый макрофагами IL-1 способствует развитию локальной и системной воспалительной реакции, а также запускает секрецию IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 и других, которые активируют Т- и В-лимфоциты [35].

Точная роль цитокинов в репаративной регенерации поджелудочной железы остаётся невыясненной, но накапливается всё больше фактов, подтверждающих участие факторов роста и дифференцировки в регуляции массы инсулин-продуцирующих клеток поджелудочной железы.

1.4.1 – Роль TNF- α в патогенезе сахарного диабета второго типа и в регенерации поджелудочной железы

Резистентность к инсулину, проявляющаяся снижением чувствительности инсулинозависимых клеток к действию инсулина с последующим нарушением метаболизма глюкозы и поступления ее в клетки, является основным патогенетическим механизмом развития СД2. Наряду с другими факторами, принимающими участие в патогенезе СД2 и инсулинорезистентности, такими, как глюколипотоксичность, активные формы кислорода, эпигенетические факторы, повышенные уровни провоспалительных цитокинов занимают одно из основных мест. Среди провоспалительных цитокинов, вовлечённых в патогенез СД2 и развитие инсулинорезистентности, одним из ведущих является TNF- α , многофункциональный провоспалительный цитокин, который синтезируется как моноцитами и макрофагами, так и

адипоцитами в периферических тканях. TNF- α вовлечён в развитие системного воспаления и инсулинорезистентности и стимулирует реакции острой фазы воспаления. Нарушение регуляции TNF- α ассоциировано с развитием многих заболеваний, в том числе и диабета второго типа [260]. При СД2 отмечается значительное увеличение уровня TNF- α в крови, причём, при наличии ожирения он возрастает ещё больше. Повышенное содержание TNF- α коррелирует с возрастанием уровня гликированного гемоглобина в крови и индексом HOMA-IR [59]. TNF- α вызывает воспаление в тканях посредством генерации активных форм кислорода, которые, в свою очередь, запускают апоптоз клеток [179, 243, 280].

TNF- α в тканях может связываться с инсулиновыми рецепторами и нарушать сигнальный путь инсулина путём фосфорилирования сериновых остатков, тем самым снижая активность рецепторов и способствуя развитию инсулинорезистентности в адипоцитах и периферических тканях [262]. Поскольку повышенный уровень TNF- α приводит к развитию резистентности, то терапия, направленная на снижение содержания TNF- α , рассматривается как способ восстановления чувствительности к инсулину и лечения СД2 [55, 57].

При СД2 хроническая гипергликемия и повышенный уровень свободных жирных кислот в организме способствуют продукции β -клетками островкового амилоидного пептида, привлекающего моноциты из костного мозга и приводящие к аккумуляции M1 макрофагов в островках. Гипергликемия активирует продукцию M1 макрофагами провоспалительных факторов IL-1 β и TNF- α , которые, воздействуя на β -клетки, приводят к их дисфункции и гибели. Погибая, β -клетки высвобождают большое количество цитокинов и хемокинов, тем самым создавая петлю обратной связи, поддерживающую воспаление в поджелудочной железе, характерное для СД2 [96]. TNF- α , являясь одним из основных провоспалительных цитокинов и индуктором развития инсулинорезистентности периферических тканей при СД2, может изменять продукцию инсулина β -клетками [101] и экспрессироваться ацинарными

клетками поджелудочной железы в ответ на повреждение [219]. Основное количество TNF- α секретируется макрофагами.

Экспрессия TNF- α в ацинарных и островковых клетках поджелудочной железы показана в экспериментах на крысах с СД2 (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats) [298], церулеиновым панкреатитом, после введения липополисахаридов [219], при ожирении [231]. Сформулировано предположение, что экспрессия гена TNF- α активируется в ацинарных клетках поджелудочной железы в ответ на стресс [219].

Большой интерес представляют данные исследований на мышах 2013 года, показывающие, что TNF-подобные цитокины TWEAK (TNF-подобные слабые индукторы апоптоза), регулирующие выживание, рост и дифференцировку клеток, количество которых резко возрастает в повреждённых тканях, стимулируют пролиферацию протоковых клеток поджелудочной железы и временную экспрессию Ngn3, что приводит к неогенезу β -клеток [279].

1.4.2 – Роль IFN- γ в патогенезе сахарного диабета второго типа и в регенерации поджелудочной железы

Интерфероны обладают антивирусной, иммуномодулирующей и противоопухолевой активностью. Интерферон гамма (IFN- γ) известен своим влиянием на процессы, связанные с клеточным иммунитетом. Он активирует макрофаги по классическому типу, в результате чего усиливается продукция провоспалительных цитокинов вместо противовоспалительных. Показано, что IFN- γ усиливает врождённый ответ и цитотоксичность макрофагов путём воздействия на уровень экспрессии микроРНК макрофагов [300]. Продукция IFN- γ характерна для активированных клеток иммунной системы: антиген-презентирующих клеток, Т-хелперов, цитотоксических лимфоцитов, натуральных киллеров. Индуцированный IFN- γ провоспалительный цитокин протеин 10 играет решающую роль при развитии воспалительных заболеваний

вообще и развития СД2, в частности [83], также IFN- γ индуцирует апоптоз β -клеток [142].

В литературе описаны исследования, расширяющие взгляд на участие IFN- γ , а также некоторых других противовоспалительных цитокинов на пролиферацию гемапозитических стволовых клеток и дифференцировку стволовых клеток поджелудочной железы [235]. В 1992 году было опубликовано исследование, показывающее, что у специально выведенных линий трансгенных мышей, ген IFN- γ которых сцеплен с промотором гена инсулина (ins-IFN- γ трансгенные мыши), вследствие чего клетки поджелудочной железы которых обладают сверхэкспрессией IFN- γ , протоковые клетки активно делятся и дифференцируются в эндокринные [246]. Авторы предполагают, что таким образом происходит восстановление количества инсулин-продуцирующих клеток в поджелудочной железе и её регенерация в ответ на повышенный уровень воспаления в клетках железы. В других исследованиях показана устойчивость к развитию стрептозотоцин-индуцированного диабета ins-IFN- γ трансгенных мышей, при этом в поджелудочной железе отмечено появление отдельных инсулин-реактивных клеток [139, 140, 226]. На основании этого предполагают, что трансформировавшиеся во взрослые клетки мультипотентные протоковые предшественники могут возвращаться к исходному мультипотентному состоянию при действии определённых сигналов [246]. Интересно, что в протоковых клетках IFN- γ трансгенных мышей обнаруживается экспрессия Pdx1, необходимого для транскрипции гена инсулина и являющегося общепринятым маркером, связанного с регенеративными процессами в поджелудочной железе [226].

1.4.3 – Участие TGF- β в патогенезе сахарного диабета второго типа и в процессах развития клеток

Трансформирующий фактор роста бета (TGF-бета) вносит определённый вклад в развитие СД2. Несмотря на то, что TGF-бета является классическим противовоспалительным медиатором, полагают, что в присутствии IL-6, количество которого возрастает при развитии СД2, он приводит к диабетической нефропатии и склерозу почек [135, 137]. TGF-бета, наряду с другими ростовыми факторами и хемокинами, регулирует миграцию макрофагов в ткани [34].

Белки суперсемейства трансформирующего фактора роста бета (TGF- β) участвуют в регуляции многих клеточных процессов в пренатальном и постнатальном периодах, включая дифференцировку и пролиферацию клеток, организацию цитоскелета, адгезию и апоптоз [103]. Основными источниками TGF- β являются моноциты и макрофаги, содержащие его постоянно, но секретирующие только при активации [25]. В качестве источника TGF- β также называют прочие клетки белой крови и клетки многих видов злокачественных опухолей [72]. TGF- β существует в виде нескольких изоформ, у млекопитающих идентифицированы три из них: TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3. Изоформы имеют сходный биологический эффект, однако наибольшей экспрессией и влиянием на процессы воспаления, ремоделирования и фибрирования сосудов и органов обладает TGF- β 1 [26]. Мыши, нокаутированные по TGF- β 1, гибнут пренатально от дефектов желточного мешка или от воспалительных заболеваний вскоре после рождения [103]. Белки суперсемейства TGF- β секретируются в виде нековалентных комплексов, связанных с пептидами, благодаря чему зрелые молекулы TGF- β могут храниться в экстрацеллюлярном матриксе в биологически неактивной форме. Активация гена TGF- β происходит путём отщепления пропептида в ответ на повреждение тканей под влиянием протеаз, интегринов, активных форм кислорода, изменения pH. Активированный TGF- β запускает внутриклеточную

передачу сигналов посредством связывания с комплексом рецепторов TGF- β . В результате фосфорилирования образовавшегося комплекса образуется трёхмерная структура, которая транслоцируется в ядро и регулирует экспрессию целевых генов посредством связывания с их чувствительными регуляторными областями.

Согласно современным представлениям цитокины действуют как паракринные факторы, ответственные за развитие и поддержание пропорций разных клеточных компонентов ткани. Предполагают, что цитокины могут модулировать развитие поджелудочной железы, в частности, TGF- β 1 участвует в регулировании количественного баланса эндокринных и экзокринных клеток железы [234, 267]. Известно, что TGF- β 1 способствует пролиферации β -клеток [92, 101, 203]. Показано, что формирование клеток дорсальной части передней кишки в эмбриогенезе частично опосредуется участниками сигнальных путей фактора роста фибробластов (FGF) и TGF- β . FGF10 необходим для развития поджелудочной железы, его недостаток блокирует пролиферацию эпителиальных клеток [130]. Совместная активность активина, являющегося лигандом TGF- β и ретиноевой кислоты, происходящей из мезенхимы поджелудочной железы, регулируют развитие эпителия железы [54]. Предполагают, что на более поздних этапах эмбрионального развития TGF- β участвует в регуляции баланса между ацинарной и эндокринной частями железы [267]. В эксперименте добавление цитокинов к культуре прогениторных клеток поджелудочной железы изменяло пропорции экзокринных и эндокринных эпителиоцитов железы. Добавление TGF- β 1 способствовало развитию эндокринных, в частности, инсулин-содержащих клеток.

При дифференцировке β -клеток из плюрипотентных стволовых клеток человека сигналы TGF- β необходимы для того, чтобы секреция инсулина созревающими β -клетками была равна продукции островковых β -клеток и чтобы она изменялась в соответствии с содержанием глюкозы в крови [51].

1.5 – Влияние макрофагов на регенерацию

Регенерация свойственна всем живым организмам, в физиологических условиях она поддерживает тканевой гомеостаз, а при повреждении – способствует восстановлению структуры и функции [199]. Эффективность регенерации можно оценить как по количеству, так и по качеству восстановления отдельных функциональных элементов [47]. Согласно современным представлениям под регенерацией ткани понимают восстановление работоспособности функциональной единицы органа, т.е. пространственно-ориентированного структурно-функционального комплекса, содержащего клеточные и волокнистые образования органа и являющимся интегральным целым, минимальной структурной единицей органа [43].

Механическое, инфекционное или токсическое повреждение ткани вызывает в ней образование определённых молекулярных комплексов, так называемых DAMP (damage-associated molecular patterns) и PAMP (pathogen-associated molecular patterns) комплексов, которые высвобождаются мёртвыми и погибающими клетками или патогенными организмами [29]. Эти комплексы выступают как молекулярные триггеры, которые путём рекрутирования, пролиферации и активации широкого спектра клеток (нейтрофилов, макрофагов, лимфоидных клеток, NK-, B-, T- клеток, фибробластов, эпителиальных и стволовых клеток) вызывают воспалительный клеточный ответ. Если размер повреждения позволяет, то, при сбалансированной регуляции воспаление завершается восстановлением структуры и функции ткани. Макрофаги, благодаря широкому спектру секретируемых медиаторов, аккумуляции в тканевых зонах роста [14], участия в образовании клеток крови в эритробластических островках [10] являются основными регуляторами регенерации тканей на всех её этапах [7, 23, 46, 200, 297].

После повреждения ткани моноциты и макрофаги претерпевают фенотипические и функциональные перестройки, влияющие на регенерацию. Нарушения функции макрофагов могут привести к неконтролируемой

продукции медиаторов воспаления и ростовых факторов, недостаточной выработке противовоспалительных факторов или нарушении взаимоотношений между макрофагами и эпителиальными клетками, фибробластами и стволовыми клетками или клетками-предшественниками.

Последовательность событий, происходящих от повреждения до регенерации, одинакова во всех тканях, и включает в себя воспалительную реакцию, пролиферацию клеток и восстановление компонентов матрикса [141, 242]. Моноциты крови, мигрируя в ткани, дифференцируются в тканевые макрофаги, которые реализуют функцию фагоцитоза, индуцируют воспалительную реакцию, стимулируют и регулируют иммунный ответ, участвуют в репаративных процессах и обмене компонентов внеклеточного матрикса [34]. Количество тканевых макрофагов возрастает при повреждении органа. Исследования показывают, что макрофаги, которые регулируют протекание воспалительной реакции, активируют стволовые клетки-предшественники, очищают повреждённую ткань от дебриса, восстанавливают структуру внеклеточного матрикса, регулируют как процесс воспаления, так и последующей регенерации или фиброза тканей [296, 301]. Если рекрутирование и/или активация макрофагов после повреждения ткани блокируется, то ранние стадии воспалительной реакции снижаются [248].

Известно, что резидентные тканевые макрофаги, оценивая микроокружение, генерируют молекулярные сигналы, локально поддерживающие стабильное состояние ткани поджелудочной железы и способствующие её регенерации [52]. Общеизвестно, что повреждение β -клеток приводит к аккумуляции макрофагов в островках, которое может иметь как положительное, так и отрицательное влияние на β -клетки, в зависимости от поляризации макрофагов. M2 макрофаги, инфильтрирующие островки, способствуют пролиферации β -клеток [203]. Предполагают, что макрофаги учитывают изменение активности островков путём анализа сигналов от β -клеток [201].

При стимуляции макрофагов IFN- γ , которая может осуществляться совместно с липополисахаридами и TNF- α , макрофаги приобретают классически активированный провоспалительный фенотип M1. M1 макрофаги уничтожают патогенного возбудителя, индуцируют воспалительную реакцию, а также участвуют в репаративной регенерации органа через секрецию фактора роста эндотелия сосудов, который стимулирует ангиогенез и образование грануляционной ткани [276].

Стимуляция макрофагов интерлейкинами, иммунными комплексами, глюкокортикоидами, антагонистами толл-подобных рецепторов, активирует их по альтернативному пути, вследствие чего они приобретают фенотип M2. M2 макрофаги, наряду с подавлением воспаления путём блокирования M1 популяции, являются репаративными макрофагами. Они синтезируют факторы роста, стимулируют репаративную регенерацию и ангиогенез. Выделяемый ими CCL2 выступает как хемоаттрактант для фиброцитов, дающих начало миофибробластам [210, 295].

Регенерация ткани осуществляется за счёт пролиферации клеток. В случае полной регенерации ткань восстанавливается полностью, в результате неполной регенерации появляется чередование функционирующей ткани и рубцов [242]. Соотношение регенерации и рубцевания зависит от типа ткани и степени повреждения. В тканях с высокой регенеративной способностью, таких, как печень или скелетные мышцы, полная регенерация достигается в результате пролиферации существующих дифференцированных клеток, а также дифференцировки стволовых предшественников и регенерации стромы органа [141].

При клеточной регенерации происходит увеличение количества клеток (гиперплазия), при внутриклеточной восстановление функции ткани происходит за счёт разрастания внутриклеточных специфических ультраструктур и увеличения размеров клеток (гипертрофия). На примере регенерации печени показано, что макрофагзависимой является клеточная регенерация, а внутриклеточная не зависит от макрофагов [42].

Таким образом, возможность образования инсулинопродуцентов вне островков Лангерганса поджелудочной железы, реализуемая в силу функциональной пластичности панкреоцитов, не вызывает сомнения у различных исследователей. Однако, морфо-функциональные характеристики внеостровковых инсулиноцитов, механизмы их образования и значение для организма в целом и для обеспечения процессов инсулинопродукции в условиях физиологической нормы и при сахарном диабете второго типа в настоящее время недостаточно изучены, что и определило тему настоящего исследования.

ГЛАВА 2 – МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В РАБОТЕ

2.1 – Общая характеристика экспериментальных животных

Эксперименты выполнены на белых крысах-самцах линии Вистар массой 300–350 г, чей возраст на момент ввода в эксперимент составлял 12–13 недель. Животные содержались в условиях вивария ИИФ УрО РАН при температуре плюс 20-22°C в условиях двенадцатичасового светового дня и неограниченного доступа к воде и пище в пластиковых клетках, предназначенных для содержания мелких грызунов. Вместимость клеток составляла 5–6 животных, их дезинфекция производилась 1 раз в неделю, смена подстилки – по мере загрязнения. В качестве корма использовали стандартный рацион – комбикорм для лабораторных мышей и крыс Дельта Фидс, ЛБК 120 С-19 (БиоПро, Россия).

В ходе работы было использовано 126 крыс. 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).

2.2 – Моделирование сахарного диабета второго типа

В работе изучалось воздействие макрофагов на внеостровковые инсулин-позитивные клетки поджелудочной железы в условиях экспериментального диабета второго типа.

2.2.1 – Экспериментальные модели диабета

Изучение осложнений диабета и поиск средств его фармакологической коррекции традиционно проводится на животных моделях, среди которых чаще всего используются грызуны. Причинами выбора мышей и крыс являются их небольшой размер, лёгкость в уходе и содержании, всеядность, неагрессивное поведение [171]. При всём многообразии экспериментальных моделей диабета их можно разделить на две большие группы – генетические и негенетические. Генетические модели, предполагающие использование чистых линий экспериментальных животных с наследственно обусловленной формой сахарного диабета, во-первых, обладают высокой стоимостью, а, во-вторых, не позволяют производить коррекцию экспериментального диабета и его осложнений. По этим причинам негенетические модели используются гораздо чаще, чем генетические. К основным негенетическим способам моделирования диабета относят хирургические (полное или частичное удаление поджелудочной железы), химические (введение веществ, избирательно воздействующих на β -клетки островков Лангерганса), эндокринные (длительное введение соматотропного и аденокортикотропного гормона или глюкокортикоидов), иммунные (введение антител к инсулину), алиментарные (кормление жирной пищей, введение в рацион фруктозы) или их комбинация (например, введение химического диабетогена стрептозотоцина наряду с высоко-жировой диетой) [171]. Каждая модель имеет ограничения в использовании.

Химические модели, наиболее популярны и востребованы в силу относительной лёгкости в исполнении, низкой стоимости и высокой воспроизводимости. К основным химическим диабетогенам относят аллоксан и стрептозотоцин, также возможно применение дитизона. Первые два являются гидрофильными аналогами глюкозы и проникают в клетки через GLUT2 рецепторы. Механизм действия аллоксана и стрептозотоцина на β -клетки поджелудочной железы достаточно хорошо изучен и реализуется посредством

образования реактивных форм кислорода, однако источник их происхождения различен для аллоксана и стрептозотоцина. Развитие диабета при введении дитизона (так называемый «цинковый» диабет) связано с его способностью образовывать соединения с цинком, необходимым для нормального депонирования и секреции инсулин β -клетками [33].

Аллоксан, избирательно влияющий на β -клетки поджелудочной железы [18], впервые был использован для индукции СД2 в 1943 году Goldner M.G. и Gomori G. [136]. Islam M.S. и Wilson R.D. в обзоре, посвящённом моделированию СД2 на грызунах [171], пишут о том, что в настоящее время всё большее число исследователей отдают предпочтению стрептозотоцину, а не аллоксану в силу меньшей эффективности последнего и его повреждающего действия на почки и печень [116, 171]. Кроме того, стрептозотоцин более устойчив в растворе, чем аллоксан. Модели с использованием стрептозотоцина воспроизводят острые и хронические осложнения диабета, свойственные людям [116].

Стрептозотоцин (2-дезоксид-2-[[[(метилнитрозоамин)карбонил]амино]-D-глюкопираноза) (Stz) – продукт жизнедеятельности почвенной бактерии *Streptomyces achromogenes*, N-нитрозопроизводное глюкозамина. Он обладает широким спектром антибактериальных свойств, реализующихся через воздействие на ДНК клеток [105]. Помимо бактериальных, стрептозотоцин действует и на клетки млекопитающих. Стрептозотоцин представляет собой кристаллический порошок бледно-жёлтого или белого цвета, хорошо растворимый в воде, кетонах и низших спиртах [116], его молекулярная формула – $C_8H_{15}N_3O_7$ [116]. Являясь цитотоксическим гидрофильным аналогом глюкозы, стрептозотоцин проникает в клетки так же, как и она, через GLUT2 рецепторы.

Раньше стрептозотоцин использовали в качестве алкилирующего агента в терапии опухолей поджелудочной железы [286]. В 1963 году Rakieten L. et al. доложили о диабетогенном действии стрептозотоцина [236], с тех пор его

используют в качестве химического индуктора диабета в экспериментах на животных.

Borouieni N.B. et al. [77] и Arias-Díaz J. и Balibrea J. [63] пишут, что уровень гипергликемии, воспроизводимый введением стрептозотоцина, может быть свойственен как первому, так и второму типам диабета в зависимости от вида, возраста и веса животных, нутриентного статуса животного на момент введения, дозы и способа введения, восприимчивости к ксенобиотикам.

Механизм действия стрептозотоцина заключается в деструкции β -клеток панкреатических островков, реализующейся посредством генерации нарушающих целостность клетки свободных радикалов кислорода, алкилирования ДНК и снижения NAD в β -клетках и угнетения активного транспорта кальция и кальмодулин-активированной протеинкиназы. Селективное поражение β -клеток островков Лангерганса происходит за счёт активации в них апоптоза [27, 39, 264]. Стрептозототин обладает меньшей токсичностью по сравнению с аллоксаном. Кроме того, он более тканеспецифичен, чем аллоксан, и поражает в большей степени именно поджелудочную железу, а не другие органы.

Вариантом модели СД2 является кормление животных высокожировой диетой в течение двух недель перед инъекцией стрептозотоцина с целью выработать резистентность к инсулину. При введении стрептозотоцина в дозе 15–50 мг/кг после усиленного кормления с превышением потребления калорий на 30–40 % сверх обычного отмечается нарушение толерантности к глюкозе и развитие гипергликемии, гиперинсулинемии и гиперлипидемии в течение следующих двух месяцев [236]. Продолжительное время, необходимое для развития диабета (являющееся результатом необходимости длительного кормления высококалорийной диетой и малой дозой стрептозотоцина) называется основным недостатком данной модели.

Для уменьшения повреждающего воздействия стрептозотоцина на β -клетки предварительно можно вводить никотинамид. Стрептозототин-никотинамидная модель диабета изначально была разработана Masiello P. et al.

[122], а впоследствии доработана как негенетическая модель СД2 без ожирения. Теоретическими предпосылками данной модели является то, что индуцированное стрептозотоцином повреждение ДНК стимулирует репаративные механизмы, для осуществления которых необходимо большое количество никотинамид аденин динуклеотида. Таким образом, введение никотинамида частично гасит избыточное повреждение β -клеток, вызванное стрептозотоцином.

Стрептозотоцин-никотинамидная модель воспроизводит СД2 без развития ожирения и характеризуется развитием стабильной умеренной гипергликемии натощак, уменьшением количества β -клеток и снижением продукции инсулина, нарушенной толерантностью к глюкозе, полифагией и полидипсией [134, 171].

2.2.2 – Адаптация и верификация модели сахарного диабета второго типа

Для воспроизведения экспериментального диабета второго типа была выбрана негенетическая химическая стрептозотоцин-никотинамидная модель. Крысам проводилось однократное внутрибрюшинное введение стрептозотоцина (Sigma, США) в дозе, рекомендованной академиком Спасовым А.А. – 65 мг/кг [39]. За 15 минут до этого внутрибрюшинно вводился никотинамид (Sigma, США). Известно, что уровень глюкозы у крыс с экспериментальным диабетом варьируется в широком диапазоне в зависимости от вводимых доз стрептозотоцина и никотинамида [263]. Можейко Л.А. пишет о необходимости соблюдения осторожности при выборе модели и дозы препарата для получения экспериментального диабета, поскольку некорректно выбранная доза может привести к получению неверного результата [19]. С целью выбора дозы никотинамида, введение которой приводило бы к развитию стойкой умеренной гипергликемии, одной группе крыс он вводилась в

количестве 230 мг/кг [39], другой – 110 мг/кг [134]. Для апробации модели СД2 были использованы 16 крыс.

Навеска стрептозотоцина растворялась в цитратном буфере (рН 4,5), никотинамида – в воде для инъекций. Инъекции производились животным натощак после двенадцатичасового голодания. Поскольку стрептозотин является структурным аналогом глюкозы и конкурирует с ней за проникновение в клетки, после введения стрептозотоцина животные получали доступ к пище не сразу, а через час.

Для оценки развившегося у крыс гипергликемического состояния были использованы следующие показатели: 1) концентрацию глюкозы в крови натощак; 2) относительное содержание гликированного гемоглобина в крови натощак; 3) концентрацию глюкозы в крови натощак и после нагрузки глюкозой (глюкозотолерантный тест).

Концентрацию глюкозы в крови определяли на третьи, седьмые, четырнадцатые, двадцать первые и тридцатые сутки после начала эксперимента. Определение уровня гликированного гемоглобина (HbA_{1c}) и пероральный глюкозотолерантный тест проводили на тридцатые сутки. Результаты исследований представлены в *таблицах 1–3*.

Гликированный (гликозилированный) гемоглобин (HbA_{1c}) – результат соединения гемоглобина с глюкозой, образующийся в результате неферментативного взаимодействия гемоглобина А эритроцитов с глюкозой крови, т.е. скорость гликирования гемоглобина прямо пропорциональна концентрации глюкозы в окружающей среде (крови). Данный биохимический параметр крови отражает среднее содержание глюкозы в крови за период жизни эритроцитов (согласно литературным данным, у человека и крыс он составляет до 100–120 суток) [66, 268].

По мнению Ильина А.В. с соавторами, поскольку циркулирующие в крови эритроциты имеют разный возраст, то при оценке уровня гликирования гемоглобина можно ориентироваться на полупериод жизни эритроцитов, т.е. на срок в 60 суток [11].

Таблица 1 – Концентрация глюкозы в крови экспериментальных животных при введении стрептозотоцина в дозе 65 мг/кг и разных доз никотинамида

Группа	Концентрация глюкозы, ммоль/л					
	Перед экспери- ментом	Период после начала эксперимента, суток:				
		3	7	14	21	30
Интакт- ная	5,75 ± 0,33	5,24 ± 0,27	5,18 ± 0,20	5,48 ± 0,28	5,44 ± 0,20	5,12 ± 0,18
После инъекций стрептозотоцина и никотинамида в дозе:						
110 мг/кг	5,4 ± 0,25	8,72 ± 1,76	9,70 ± 0,42 ¹	10,84 ± 0,90 ¹	11,76 ± 0,73 ¹	12,86 ± 1,09 ₁
230 мг/кг	5,4 ± 0,25	8,7 ± 1,8 ¹	9,5 ± 1,4 ¹	6,8 ± 0,8	8,8 ± 1,9 ₁	5,3 ± 0,3

Примечание: ¹ – $p < 0,05$ в сравнении с интактной группой.

Определение уровня гликирования гемоглобина используется в качестве метода оценки уровня гликемии и диабетического статуса уже несколько десятилетий, с тех пор, как в 50–60-х годах прошлого века была показана электрофоретическая и хроматографическая неоднородность гемоглобина у здоровых людей и диабетиков [227]. Международный комитет экспертов, включающий представителей Американской диабетической ассоциации, Европейской ассоциации по изучению диабета и международной диабетической федерации рекомендует использовать тест на HbA_{1c} для диагностики диабета с порогом $\geq 6,5\%$ [165].

В группе с вводимой дозой никотинамида 110 мг/кг через 30 суток после инъекций содержание HbA_{1c} достоверно превышало контрольные значения, а в группе с более высокой дозой никотинамида подобных отличий не наблюдалось (таблица 2).

Таблица 2 – Относительное содержание гликированного гемоглобина (HbA_{1c}) в крови экспериментальных животных при введении стрептозотоцина в дозе 65 мг/кг и разных доз никотинамида

Показатель	Группа животных		
	Интактная	С введением никотинамида:	
		в дозе 110 мг/кг	в дозе 230 мг/кг
HbA _{1c} , %	4,33 ± 0,19	6,6 ± 0,21 ¹	3,4 ± 0,5

Примечание: ¹ – $p < 0,05$ в сравнении с интактной группой.

Глюкозотолерантный тест (ГТТ) – метод исследования, применяемый для диагностики нарушения толерантности к глюкозе и диагностики сахарного диабета. Согласно Bowe J.E. et al., ГТТ и определение уровня гормонов (инсулина) лежат в основе исследования гомеостаза глюкозы у грызунов [193], причём, ГТТ отмечается ими как самый распространённый метод оценки гомеостаза. СД2 характеризуется развитием толерантности к глюкозе, которая вносит свой вклад как в развитие периферической (в мышцах, жировой ткани и печени) инсулинорезистентности, так и в формирование дисфункции β -клеток.

По данным ВОЗ, о нарушенной (пониженной) толерантности к глюкозе можно говорить при наличии достоверных отличий концентрации глюкозы в плазме крови через 120 минут после пероральной нагрузки глюкозой по сравнению с этим показателем до введения глюкозы [102]. Bowe J.E. et al. говорят о двух вариантах оценки результатов ГТТ: 1) на основании сравнения абсолютных значений уровня глюкозы до и после нагрузки; 2) оценкой площади под гликемической кривой (area under the curve – AUC) [193]. Увеличенная площадь под кривой и длительность времени восстановления уровня глюкозы до исходных значений свидетельствует в пользу развития толерантности к глюкозе.

При проведении теста толерантности к глюкозе животным после двенадцатичасового голодания перорально с помощью стальных зондов для перорального дозирования (VetTech Solutions Ltd., Великобритания) вводился раствор глюкозы в воде в дозе 1 г/кг массы крысы. Образцы крови на анализ забирались из хвостовой вены через 30, 60 и 120 минут после нагрузки глюкозой [127], концентрация глюкозы в крови измерялась с помощью глюкометра и тест-полосок Contour TC.

Через 120 минут после нагрузки глюкозой её содержание в венозной плазме достоверно превышало значение до начала теста в обеих группах с введением разных доз никотинамида (*таблица 3*). Анализ гликемических кривых, полученных в результате проведения ГТТ у крыс через 30 суток после введения им стрептозотоцина и никотинамида, показывает, что площадь под

кривой при введении никотинамида в дозе 110 мг/кг превышает таковую при введении дозы 230 мг/кг (рисунк 1).

Таблица 3 – Концентрация глюкозы в крови в тесте толерантности к глюкозе у экспериментальных животных через 30 суток после введения стрептозотоцина в дозе 65 мг/кг и разных доз никотинамида

Группа животных	Концентрация глюкозы, ммоль/л			
	До нагрузки	Время после нагрузки глюкозой (1 г/кг) в минутах		
		30	60	120
Интактная	5,2 ± 0,4	8,9 ± 0,3 ¹	6,6 ± 0,9	5,3 ± 0,8
С введением никотинамида				
в дозе 110 мг/кг	9,2 ± 0,3	18,0 ± 2,4 ¹	12,2 ± 0,2 ¹	11,9 ± 0,6 ¹
в дозе 230 мг/кг	5,3 ± 0,3	9,5 ± 1,9 ¹	8,6 ± 1,4 ¹	9,4 ± 1,8 ¹

Примечание: ¹ – $p < 0,05$ в сравнении со значениями до нагрузки глюкозой в своей группе.

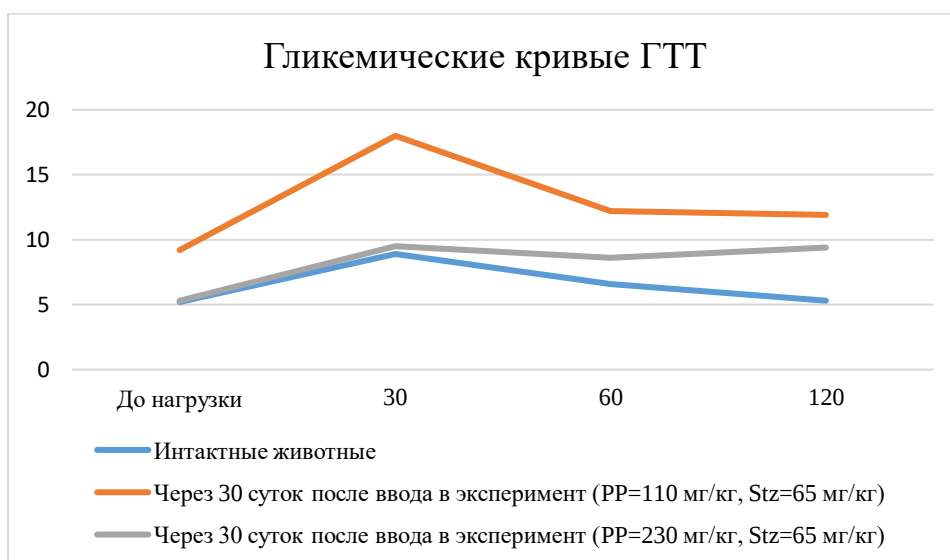


Рисунок 1 – Гликемические кривые при проведении глюкозотолерантного теста через 30 суток после введения стрептозотоцина в дозе 65 мг/кг и разных доз никотинамида (по оси абсцисс – время после нагрузки глюкозой в минутах, по оси ординат – уровень глюкозы в плазме крови, ммоль/литр)

Примечание: PP – никотинамид; Stz – стрептозотозин.

На основании данных, представленных в таблицах 2–4, для превентивного введения никотинамида была выбрана доза 110 мг/кг. Модель СД2 в таком виде (110 мг/кг никотинамида и 65 мг/кг стрептозотоцина) приводит

к развитию умеренной стойкой гипергликемии, при которой уровень глюкозы сохраняется на уровне $12,86 \pm 1,09$ ммоль/л ммоль/л на 30-е сутки от момента введения стрептозотоцина. Для верификации модели СД2 были использованы показатели тощакового содержания глюкозы, гликированного гемоглобина (HbA_{1c}) и инсулина в крови, тест толерантности к глюкозе и индекс НОМА-IR для оценки инсулинорезистентности.

Резистентность к инсулину, проявляющаяся снижением чувствительности инсулинозависимых клеток к действию инсулина с последующим нарушением метаболизма глюкозы и поступления ее в клетки, является основным патогенетическим механизмом развития СД2. Расчёт индекса инсулинорезистентности НОМА-IR (Homeostatic model assessment) относится к ранним способам оценки функций β -клеток и резистентности к инсулину. Его используют в клинической практике для ранней диагностики СД2, а также в научных исследованиях, в том числе на грызунах [126, 194, 211, 287]. Wallace T.M. et al. считают [287], что допустимо использовать НОМА-IR в научных исследованиях при моделировании диабета. Они пишут об удобстве этого метода, так как на основании данных о содержании глюкозы и инсулина в плазме крови можно сделать вывод и выработке инсулинорезистентности в той или иной модели. Соотношение глюкозы и инсулина отражает баланс между выбросом глюкозы печенью и секрецией инсулина, который поддерживается петлёй обратной связи между печенью и β -клетками. Изначально формула для расчёта индекса НОМА-IR была предложена Matthews D.R. et al. [144]. В упрощённом виде формула выглядит следующим образом:

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

Увеличение значения НОМА-IR наблюдается при повышении уровня глюкозы или инсулина в крови натощак. Это соответствует повышению резистентности клеток и тканей к инсулину и повышенному риску развития СД2. Данные для расчёта индекса НОМА-IR приведены в *таблице 4*. Исходя из

них, можно говорить о развитии толерантности к глюкозе при моделировании СД2.

Таблица 4 – Концентрация глюкозы и инсулина в крови и значения индекса НОМА-IR при моделировании сахарного диабета второго типа введением никотинамида в дозе 110 мг/кг и стрептозотоцина в дозе 65 мг/кг

Показатель	Группы животных		
	Интактная	Сахарный диабет 2 типа	
		30 суток	60 суток
Глюкоза в крови, ммоль/л	$5,12 \pm 0,18$	$12,86 \pm 1,09^1$	$12,44 \pm 0,26^1$
Инсулин в крови, мкЕд/мл	$22,08 \pm 1,85$	$16,94 \pm 0,89^1$	$15,19 \pm 0,46^1$
Индекс НОМА-IR	$5,02 \pm 0,15$	$9,68 \pm 0,35^1$	$8,39 \pm 0,23^1$

Примечание: ¹ – $p < 0,05$ в сравнении с интактной группой; НОМА-IR (Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance) – индекс, используемый для оценки инсулинорезистентности.

2.3 – Метод воздействия на функциональную активность макрофагов

Воздействие на функциональное состояние макрофагов в эксперименте осуществлялось введением натриевой соли 5-амино-2,3-дигидрофталазин-1,4-диона (аминофталгидразид натрия, далее – АФГ). Данное вещество присутствует в общедоступных базах данных, его идентификационный номер в PubChem (PubChemCID) 9794222, InChI Key: JKEBMURXLKGPLR-UHFFFAOYSA-N, молекулярная формула $C_8H_6N_3NaO_2$ [233], структурная формула представлена на *рисунке 2*.

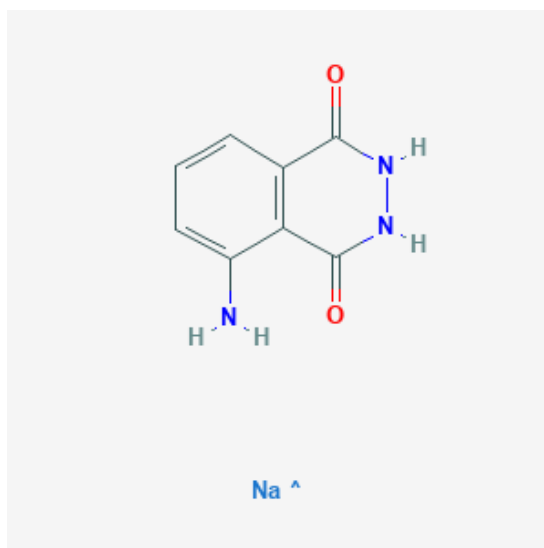


Рисунок 2 – Структурная формула натриевой соли 5-амино-2,3-дигидрофталазин-1,4-диона

АФГ описан в литературе как вещество с противовоспалительным действием, способное стимулировать функциональную активность макрофагов, их секреторную и антиген-презентирующие функции [1, 20, 22, 49, 176, 195]. Ингибирование секреции воспалительных цитокинов отмечено в том числе в модели СД1 [224]. Основной фармакологической мишенью АФГ являются макрофаги, показано его влияние на морфометрические параметры и синтетическую активность макрофагов *in vivo* и *in vitro* [30, 176]. Тропность натриевой соли 5-амино-2,3-дигидрофталазин-1,4-диона к фагоцитирующим клеткам, к которым относятся макрофаги, основана на специфическом реагировании АФГ с активными формами кислорода, образующимся в фагосомах [71, 283].

Ранее показано влияние АФГ на репаративную регенерацию почек и печени [14, 37, 50], частичное восстановление количества β -клеток в островках Лангерганса поджелудочной железы и снижение гипергликемии при экспериментальном СД1 [16, 224], блокирование выраженного системного воспаления при экспериментальном распространённом панкреонекрозе [24], смену экссудативно-деструктивной фазы воспаления на пролиферативно-клеточную при остром коронарном синдроме и инфаркте миокарда [197]. АФГ,

растворённый в воде, вводился крысам в виде внутримышечных инъекций в дозе 2 мг/кг [14, 224].

Продemonстрированное ранее усиление пролиферации β -клеток в островках Лангерганса при аллоксановом диабете на фоне введения АФГ [224] явилось одной из причин выбора данного препарата в качестве корректора патологических процессов, влияющих на внеостровковые ИПК в условиях экспериментального СД2. Поскольку уровень воспаления в поджелудочной железе влияет на интенсивность трансдифференцировки панкреоцитов [2210], то особый интерес для изучения механизмов, регулирующих образование ИПК в паренхиме неэндокринной части поджелудочной железы, представляют препараты, оказывающие противовоспалительное действие, к которым относится АФГ.

2.4 – Описание экспериментальных групп

Экспериментальные животные случайным образом были распределены на группы, среди которых в двух были крысы с экспериментальным СД2 продолжительностью 30 ($n = 25$) и 60 суток ($n = 25$) соответственно. С целью изменения активности макрофагов в третьей группе животных ($n = 25$) через 30 суток после введения диabetогена была проведена серия из 20 внутримышечных инъекций аминофталгидразида натрия (АФГ) в дозе 2 мг/кг по установленной схеме [224]. К группе с введением АФГ была поставлена контрольная группа ($n = 10$), исследуемые показатели в данных группах не отличались. Одна группа оставлена в качестве интактной ($n = 25$).

Животных выводили из эксперимента после двенадцатичасового голодания передозировкой золетила (15 мг/кг), предварительно взяв кровь из хвостовой вены. После проведения срединной лапаротомии были изъяты поджелудочные железы животных. В крови животных определяли концентрацию глюкозы, инсулина, TGF- β 1, TNF- α , IFN- γ и SCF, относительное содержание гликированного гемоглобина (HbA_{1c}) и количество лейкоцитов.

Ткань поджелудочной железы исследовали иммуногистохимически и методом иммуноферментного анализа.

2.5 – Исследование содержания глюкозы и гликированного гемоглобина в крови

Концентрацию глюкозы в крови определяли количественным глюкозооксидазным методом. В качестве пробы использовалась плазма исследуемой крови, в качестве реагента – первичный конгломерат Глюкоза-Ново В-8056 (Вектор-Бест, Россия). Метод определения основан на том, что глюкоза окисляется кислородом воздуха в присутствии глюкозооксидазы с образованием глюконовой кислоты и перекиси водорода. Перекись водорода под действием пероксидазы в реакции с 4-аминоантипирином и фенолом образует окрашенный продукт – хинонимин, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации глюкозы в анализируемой пробе и измеряется фотометрически при длине волны 510 нм. Оптическую плотность исследуемых образцов измеряли на спектрофотометре DU-800 фирмы «Beckman Coulter» (США), в качестве единиц измерения использовали миллимоль на литр (ммоль/л).

Относительное содержание гликозилированного (гликированного) гемоглобина (HbA_{1c}) определяли в цельной крови с использованием набора реактивов «Диабет-тест» (Фосфосорб, Россия) методом, основанным на афинной хроматографии гликозилированной и негликозилированной фракций гемоглобина в гемолизате крови. Используемый в микроколонках набора сорбент с привитой 3-аминофенилборной кислотой обеспечивает на первой стадии специфическое связывание гликозилированного гемоглобина и его отделение от негликозилированной фракции. На второй стадии происходит полная элюция гликозилированной фракции за счёт вытеснения сорбента сорбитолом. С помощью спектрофотометра DU-800 (Beckman Coulter, США) измерялись оптические плотности обеих фракций при длине волны 414 нм, на

основании чего рассчитывалось относительное содержание гликозилированного гемоглобина в анализируемой пробе в процентах.

2.6 – Исследование содержания количества лейкоцитов в крови

Общее количество лейкоцитов в крови определяли на гематологическом анализаторе Celly 70 (Biocode Nysel, Франция), адаптированном для ветеринарных исследований, и выражали в тыс/мкл.

2.7 – Иммуноферментные методы исследования

С помощью иммуноферментного метода анализа (ИФА) определяли содержание гормонов инсулина и кортикостерона в плазме крови, а также фактора роста опухоли альфа (TNF- α), интерферона гамма (FN γ), трансформирующего ростового фактора β 1 (TGF- β 1) и фактора стволовой клетки (SCF) в крови и поджелудочной железе.

2.7.1 – Исследование крови экспериментальных животных методом иммуноферментного анализа

Содержание инсулина, кортикостерона, TNF- α , IFN- γ , TGF- β 1 и SCF в крови определяли методом твёрдофазного иммуноферментного анализа сэндвич-методом с использованием прибора LAZURITE AUTOMATED ELISA SYSTEM (Dynex Technologies Inc., США) по стандартному протоколу проведения иммуноферментного исследования.

Кровь, исследуемую методом ИФА, брали из хвостовой вены, смешивали с гепарином, после чего центрифугировали в течение 10 минут на скорости 5000 оборотов в минуту при температуре +4°C на центрифуге Sigma 3K30 (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Германия).

Иммуноферментный анализ (ELISA, сокращение от английского наименования метода enzyme-linked immunosorbent assay) – лабораторный иммунологический метод выявления антигенов в исследуемом образце, в основе которого лежит образование комплекса «антиген – антитело» [36]. При проведении твёрдофазного ИФА тестируемые образцы жидкости добавляют в лунки предназначенных для этого полистироловых планшеток, на дне которых сорбированы антитела. Антигены из исследуемого образца специфически связываются с иммобилизованными антителами. После добавления вторичных антител, конъюгированных с ферментативной меткой, в качестве которой обычно используют пероксидазу хрена, формируется так называемый «сэндвич» из антител и антигенов, давший название методу. Далее добавляют хромоген-субстрат для фермента. Каждая стадия завершается промывкой лунок планшета буфером с детергентом, что приводит к удалению свободного антигена субстрат расщепляется ферментом, что приводит к изменению интенсивности окраски продукта реакции, причём интенсивность окраски прямо пропорциональна количеству связавшихся молекул антигена и антител (рисунок 3).

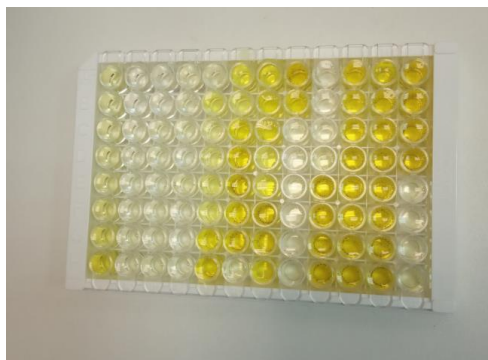


Рисунок 3 – Внешний вид планшета из набора для определения содержания фактора стволовой клетки в крови и гомогенате ткани после измерения оптической плотности жидких проб

Оптическую плотность жидких проб в планшете измеряли с помощью иммуноферментного автоматического анализатора «LAZURITE» по отношению интенсивности потока излучения, проходящего через измеряемый

образец, и потока, падающего на него. Значения оптической плотности приводили в соответствие с концентрацией тестируемых веществ в соответствии с рекомендациями, указанными в методических указаниях к наборам для ИФА. Перечень наборов реагентов для проведения ИФА, использованных в работе, приведён в *таблице 5*.

Таблица 5 – 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, Great Britain
TNF- α	TNF alpha Rat ELISA Kit, Invitrogen-Thermo Fisher Scientific, США
IFN- γ	IFN gamma Rat ELISA Kit, Invitrogen-Thermo Fisher Scientific, США
TGF- β 1	TGF beta-1 Rat ELISA Kit, Invitrogen-Thermo Fisher Scientific, США
SCF	Rat Stem Cell Factor/Mast Cell Growth Factor (SCF/MGF) ELISA Kit, Cusabio, США

Примечание: TNF- α – фактор некроза опухоли альфа; IFN- γ – интерферон гамма; TGF- β 1 – трансформирующий фактор роста бета 1; SCF – фактор стволовой клетки.

2.7.2 – Исследование поджелудочной железы экспериментальных животных методом иммуноферментного анализа

Исследование содержания TNF- α , IFN- γ , TGF- β 1 и SCF в поджелудочной железе проводили в гомогенате ткани поджелудочной железы. Извлечённую после проведения срединной лапаротомии поджелудочную железу промывали от крови в фосфатно-солевом буфере (phosphate-buffered saline – PBS) с pH 7,4 (Эко-Сервис, Россия). Промытую ткань помещали в PBS из расчёта 1 мл на 1 мг ткани и дезагрегировали (гомогенизировали) с помощью автоматизированной системы для дезагрегации тканей BD Medimachine (BD Bioscience, США). В целях предотвращения протеолиза процедуру проводили на льду.

Полученный экстракт ткани поджелудочной железы центрифугировали на центрифуге Sigma 3K30 (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Германия) в течение 30 минут при 15000 оборотах в минуту при температуре +4 °С. Полученный супернатант собирали, разводили в 2 раза PBS, разливали в эппендорфы по 200 мкл и хранили при температуре -80 °С вплоть до момента проведения исследования.

2.8 – Иммуногистохимическое исследование поджелудочной железы экспериментальных животных

Иммуногистохимическое исследование (ИГХ) использовали для выявления инсулин-, F4/80-, Pdx1- и c-kit-позитивных клеток в ацинусах и эпителии протоков поджелудочной железы (вне островков). Антитела, использованные в работе, перечислены в таблице (таблица 6).

Таблица 6 – Перечень антител, использованных для проведения иммуногистохимического исследования ткани поджелудочной железы экспериментальных животных

Выявляемый в ткани антиген	Первичное антитело: клон, производитель, разведение	Вторичное антитело: клон, производитель, разведение
Инсулин	Anti-Insulin/Proinsulin, клон INS04+INS05, Invitrogen, США, 1:200	Biotin Goat anti-Mouse Ig (Multiple Absorption), BD Pharmingen, США, 1:500
c-kit	Anti-c-kit, orb 10286, Biorbyt, Великобритания, 1:160	Biotin Goat anti-Rabbit Ig G, Thermo Fisher, Scientific, США, 1:500
F4/80	Polyclonal anti-F4/80, PA5-21399, Thermo Fisher Scientific, США, 1:400	Biotin Goat anti-Rabbit Ig G, Thermo Fisher, Scientific, США, 1:500
Pdx1	Anti-PDX1, ab 227586, Abcam, США, 1:250	Goat anti-Rabbit IgG (H+L) + Texas Red, Thermo Fisher Scientific, США, 1:100

Примечание: c-kit – рецептор к фактору стволовой клетки; F4/80 – белок, экспрессируемый на мембране макрофагов; Pdx1 – фактор транскрипции.

Идентификация антигенов велась непрямым пероксидазным методом окрашивания, для выявления Pdx1 использовали вторичные антитела, конъюгированные с флуоресцентной меткой [12, 45].

Поджелудочные железы экспериментальных животных после извлечения фиксировали в десятипроцентном нейтральном забуференном формалине в течение 24 часов при комнатной температуре, после чего промывали в течение 6–8 часов проточной водопроводной холодной водой. С целью замещения фиксирующего раствора парафином ткань подвергали обработке по стандартной методике, подвергая её воздействию этилового спирта в возрастающей концентрации, трёх смен ксилола и двух смен горячего парафина. Гистологическую проводку материала проводили с использованием автоматического тканевого процессора Leica TP 1020 (Leica Biosystems, Германия). После заливки ткани в парафин на ручном санном микротоме Leica SM2000R (Leica Microsystems, Германия) изготавливались срезы толщиной 3–4 мкм, которые помещались на предметные стёкла с адгезивным покрытием Superfrost Plus (Thermo Scientific, США). После высушивания на стёклах срезы подвергали депарафинизации, дегидратации и промывке в 0,025 % растворе Tween 20 (PanReac AppliChem GmbH, Германия) в PBS.

Для раскрытия антигенных детерминант, замаскированных вследствие образования между белковыми молекулами метиленовых мостиков во время нахождения ткани в формалине, при проведении иммуногистохимического исследования ткани рекомендуют проводить демаскировку антигенов. В данном исследовании при выявлении F4/80, c-kit и Pdx1 производили высототемпературную демаскировку, для чего срезы выдерживали в цитратном буфере (pH 6,0) при температуре +95°C в течение 20 минут. Выявление инсулина проводилось без демаскировки.

Для минимизации фонового окрашивания проводили блокировку активности эндогенной пероксидазы путём нанесения на срезы на 7 минут трёхпроцентного раствора перекиси водорода (кроме случаев окрашивания на

Pdx1) и нанесение на 30 минут протеинового блока на основе бычьего сывороточного альбумина.

Исследуемые срезы инкубировали с соответствующими первичными антителами в течение ночи при температуре +4°C и в течение 60 минут при температуре +37°C. Этапы иммуногистохимического окрашивания отделялись друг от друга промывкой в трёх сменах 0,025 % Tween 20-PBS, продолжительностью по 3 минуты каждая.

Для визуализации антигенреактивных клеток (кроме случая окрашивания на Pdx1) использовали хромогенный субстрат 3,3-диаминобензидин (DAB Substrate Kit, BD Pharmingen, США) в забуференном растворе. DAB-позитивные клетки поджелудочной железы выявляли с помощью светового микроскопа Leica TM 2500 (Leica Microsystems, Германия) по коричневому гранулярному окрашиванию цитоплазмы.

Для выявления Pdx1 в ткани поджелудочной железы использовали вторичные антитела, конъюгированные с флуоресцентной меткой. Визуализацию проводили на конфокальном сканирующем микроскопе LSM 710 (Carl Zeiss, Германия).

Для проверки протокола и исключения неспецифического связывания и ложно-позитивного окрашивания проводили постановку негативного и позитивного контроля.

Для осуществления позитивного контроля окрашивания на инсулин был выбран, так называемый, внутренний позитивный контроль, при котором присутствие антигена в образце известно *a priori*. Для инсулина безусловным позитивным контролем являются островки Лангерганса здоровых животных [94]. Позитивным контролем для иммуногистохимического выявления Pdx1 также служила ткань поджелудочной железы здоровых крыс [148].

Негативные контроли окрашивания производили на аналогичных срезах поджелудочной железы по соответствующим протоколам, исключая первичные антитела [12, 148].

2.8.1 – Анализ срезов поджелудочной железы, окрашенных с применением антител к инсулину

В работе изучались и анализировались клетки в составе ацинусов и эпителия протоков поджелудочной железы, в которых при иммуногистохимическом исследовании с применением антител к инсулину и проинсулину выявлялось позитивное окрашивание (внеостровковые инсулин-позитивные клетки). В ходе морфометрического исследования поджелудочной железы подсчитывалось количество единичных и собранных малыми группами (до пяти штук) инсулин-позитивных клеток (ИПК) ацинарной и протоковой локализации на мм^2 паренхимы железы ($\text{N}/\text{мм}^2$). Исследование ИПК включало определение их площади (мкм^2) 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. Площадь клеток определяли средствами программного обеспечения Leica Application Suite (Leica, Германия), а оптическую плотность цитоплазмы, характеризующую функциональную активность клеток, оценивали в программе ВидеоТест Морфология 5.0 (ООО “ВидеоТест”, Россия).

2.8.2 – Выявление макрофагов в поджелудочной железе

Выявление макрофагов в ткани поджелудочной железы проводили методом иммуногистохимии с применением антител к F4/80, экспрессия которого характерна для мембран тканевых макрофагов, в том числе макрофагов в поджелудочной железе [58, 82, 121, 149, 191]. Участие белка F4/80 в образовании антиген-специфичных эфферентных регуляторных Т-клеток [272] позволяет предположить вовлечённость F4/80-позитивных макрофагов в развитие воспалительных реакций. Оценивалось количество F4/80-позитивных

клеток в ацинусах и в эпителии протоков железы в пересчёте на мм² паренхимы органа.

2.8.3 – Анализ срезов поджелудочной железы, окрашенных с применением антител к Pdx1

Белок Pdx1 – продукт гена *Pdx1* (Pancreas duodenum homeobox 1), известный также как фактор 1 промотора инсулина, ключевой транскрипционный фактор, необходимый для развития поджелудочной железы. В ходе исследования было подсчитано количество Pdx1-позитивных клеток в экзокринной части поджелудочной железы и в эпителии протоков железы в пересчёте на мм² паренхимы органа.

2.8.4 – Анализ срезов поджелудочной железы, окрашенных с применением антител к c-kit

C-kit (CD117) – это рецепторная тирозинкиназа, продукт гена KIT. Данный рецептор расположен преимущественно на мембране стволовых клеток. C-kit экспрессирован на поверхности гематопоетических стволовых клеток, а также некоторых других, является рецептором для фактора роста стволовых клеток. Оценивалось количество c-kit-позитивных клеток в поджелудочной железе вне панкреатических островков в перерасчёте на 1 мм² паренхимы органа.

2.9 – Статистические методы, использованные в работе для обработки экспериментального материала

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 [40]. Критический уровень значимости p при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05.

ГЛАВА 3 - ВНЕОСТРОВКОВЫЕ ИНСУЛИН-ПОЗИТИВНЫЕ КЛЕТКИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ ВТОРОГО ТИПА

Инсулин синтезируется в-клетками островков Лангерганса в ответ на изменение уровня глюкозы в крови. Синтез инсулина определён на генетическом уровне и жёстко регулируется комплексом генов и транскрипционных факторов [147]. Помимо в-клеток в составе островков, инсулин-содержащие (инсулин-позитивные) клетки расположены в паренхиме неэндокринной части поджелудочной железы вне островков Лангерганса [48].

3.1 – Внеостровковые инсулин-позитивные клетки в поджелудочной железе intactных крыс

В ходе работы показано, что внеостровковые инсулин-позитивные клетки (ИПК) могут находиться в составе ацинусов и в эпителии протоков поджелудочной железы, располагаясь поодиночке или малыми группами (рисунок 4).

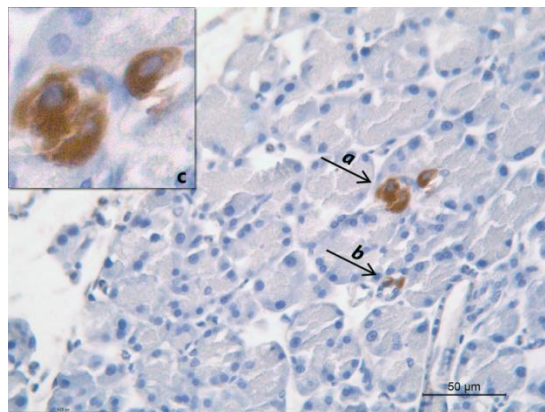


Рисунок 4 –Инсулин-позитивные клетки в паренхиме поджелудочной железы крысы

Примечание: иммуногистохимическое окрашивание среза поджелудочной железы с использованием антител к проинсулину и инсулину, контрастное докрашивание гематоксилином. Цитоплазма инсулин-позитивных клеток имеет коричневое окрашивание. Стрелками показаны инсулин-позитивные клетки: а – в ацинусе железы; b – в протоке железы; c – увеличенный фрагмент. Увеличение x 400.

У интактных крыс большая часть ИПК располагается в панкреатических островках, в то время как количество внеостровковых ИПК составляет не более 3 % от общего числа инсулин-содержащих клеток (таблица 7).

Таблица 7 – Островковые и внеостровковые инсулин-позитивные клетки (ИПК) в поджелудочной железе экспериментальных животных

	Экспериментальная группа			
	Интактная	Сахарный диабет 2 типа (СД2):		
		30 суток	60 суток	60 суток + АФГ
Количество ИПК на мм ² паренхимы железы, штук				
Все ИПК железы	169,82 ± 43,23	58,22 ± 12,97 ¹	40,32 ± 15,27 ¹	120,52 ± 27,03 ³
Внеостровковые ИПК железы	3,5 ± 0,54	3,15 ± 0,34	1,81 ± 0,24 ^{1; 2}	8,65 ± 1,66 ^{1; 2; 3}
Содержание внеостровковых ИПК от всех ИПК, %				
	2,47 ± 0,52	6,87 ± 1,17 ¹	10,32 ± 3,86 ¹	6,71 ± 2,1

Примечание: ¹ – $p < 0,05$ в сравнении с интактной группой; ² – $p < 0,05$ в сравнении с группой СД2 продолжительностью 30 суток; ³ – $p < 0,05$ в сравнении с группой СД2 продолжительностью 60 суток; АФГ – аминифталгидразид натрия.

Подсчёт количества внеостровковых ИПК разных локализаций в поджелудочной железе крыс показал, что эти клетки располагаются преимущественно в составе ацинусов экзокринной части поджелудочной железы, где их количество более чем в 3,5 раза превышает таковое в эпителии протоков железы (таблицы 8–9).

Морфометрический анализ показал, что большая часть ИПК как ацинарной, так и протоковой локализации у крыс объединена в группы (таблица 8).

Таблица 8 – Количество внеостровковых инсулин-позитивных клеток (ИПК) разной локализации в поджелудочной железе экспериментальных животных

	Экспериментальная группа			
	Интактная	Сахарный диабет 2 типа (СД2):		
		30 суток	60 суток	60 суток + АФГ
Общее количество внеостровковых ИПК, штук на мм ² площади паренхимы железы				
Всего	3,5 ± 0,54	3,15 ± 0,34	1,81 ± 0,24 ^{1; 2}	8,65 ± 1,66 ^{1; 2; 3}
из них:				
В составе ацинусов	2,8 ± 0,37	2,61 ± 0,33	1,86 ± 0,43 ²	8,23 ± 1,71 ^{1; 2; 3}
В эпителии протоков	0,71 ± 0,24	0,54 ± 0,16	0,28 ± 0,12 ^{1; 2}	1,74 ± 0,24 ^{1; 2; 3}
В том числе:				
расположенные одиночно ИПК, штук на мм ² площади паренхимы железы				
В составе ацинусов	0,28 ± 0,09	0,78 ± 0,14 ¹	0,28 ± 0,09 ²	1,94 ± 0,36 ^{1; 2; 3}
В эпителии протоков	0,12 ± 0,05	0,11 ± 0,04	0,17 ± 0,07	0,52 ± 0,06 ^{1; 2; 3}
ИПК в группах, штук на мм ² площади паренхимы железы				
В составе ацинусов	2,51 ± 0,34	1,83 ± 0,27	1,58 ± 0,42	6,29 ± 2,05 ^{1; 2; 3}
В эпителии протоков	0,59 ± 0,19	0,43 ± 0,15	0,09 ± 0,06 ¹	1,22 ± 0,28 ^{1; 3}

Примечание: ¹ – $p < 0,05$ в сравнении с интактной группой; ² – $p < 0,05$ в сравнении с группой СД2 продолжительностью 30 суток; ³ – $p < 0,05$ в сравнении с группой СД2 продолжительностью 60 суток; АФГ – аминофталгидразид натрия.

Таблица 9 – Соотношение инсулин-позитивных клеток (ИПК) в ацинарной и протоковой локализациях

Доля внеостровковых ИПК в локализации от всех внеостровковых ИПК, %	Экспериментальная группа			
	Интактная	Сахарный диабет 2 типа (СД2):		
		30 суток	60 суток	60 суток + АФГ
В ацинусах	81,05 ± 5,02 ¹	82,98 ± 5,39 ¹	78,28 ± 7,86 ¹	76,51 ± 6,89 ¹
В протоках	18,95 ± 5,02	17,02 ± 5,39	21,72 ± 7,86	23,49 ± 6,89

Примечание: ¹ – $p < 0,05$ в сравнении с долей протоковых ИПК внутри одной экспериментальной группы; АФГ – аминофталгидразид натрия.

3.1.1 – Морфологическая характеристика и оценка функциональной активности внеостровковых инсулин-позитивных клеток поджелудочной железы интактных крыс

Морфофункциональное описание ИПК, проведённое в работе, включало в себя определение площади клеток и оптической плотности цитоплазмы инсулин-позитивной области, на основании значения которой можно сделать вывод об активности процессов, происходящих в клетке, и, как следствие, количестве инсулина в ней. Морфометрический анализ показал, что у интактных животных пул внеостровковых ИПК не является однородным, клетки имеют разные размеры в зависимости от локализации. В пределах одной локализации размеры клеток могут отличаться в зависимости от характера их залегания (одиночно или в составе группы).

Размеры одиночных внеостровковых ИПК отличаются в зависимости от их локализации в поджелудочной железе. Средняя площадь ацинарных ИПК почти в два раза больше, чем у протоковых. При этом размеры ацинарных ИПК схожи вне зависимости от того, располагаются ли они поодиночке или в составе группы, а площадь одиночных протоковых ИПК значительно меньше, чем протоковых ИПК, расположенных группами (таблица 10).

Таблица 10 – Площадь внеостровковых инсулин-позитивных клеток (ИПК) поджелудочной железы

	Экспериментальная группа			
	Интактная группа	Сахарный диабет 2 типа (СД2):		
		30 суток	60 суток	60 суток + АФГ
Площадь одиночных ИПК, мкм ²				
В составе ацинусов	89,23 ± 12,97 ⁴	123,49 ± 13,25 ^{1; 4}	109,03 ± 24,98 ⁴	85,8 ± 5,1 ²
В протоках	47,65 ± 7,45	37,2 ± 7,45	47,8 ± 7,31	68,7 ± 9,7 ^{1; 2; 3}
Площадь ИПК в группах, мкм ²				
В составе ацинусов	98,69 ± 5,51	108,88 ± 4,98	76,03 ± 6,18 ^{1; 2}	83,88 ± 6,24 ^{1; 2}
В протоках	92,97 ± 5,26	47,88 ± 1,68 ^{1; 4}	72,34 ± 5,54 ²	49,98 ± 0,04 ^{1; 3; 4}

Примечание: ¹ – $p < 0,05$ в сравнении с интактной группой; ² – $p < 0,05$ в сравнении с группой СД2 продолжительностью 30 суток; ³ – $p < 0,05$ в сравнении с группой СД2 продолжительностью 60 суток; ⁴ – $p < 0,05$ со значением «средняя площадь ИПК в протоках» внутри одной экспериментальной группы; АФГ – аминофталгидразид натрия.

Функциональная активность ИПК оценивалась по оптической плотности цитоплазмы в инсулин-позитивной области клеток, выражаемой в условных единицах. У интактных крыс не выявлено отличий в значениях оптической плотности цитоплазмы между внеостровковыми и островковыми ИПК и между внеостровковыми ИПК ацинарной и протоковой локализаций (таблица 11).

Одиночное или групповое расположение также не влияет на величину оптической плотности цитоплазмы (таблица 11).

Таблица 11 – Оптическая плотность (ОП) цитоплазмы инсулин-позитивных клеток (ИПК) поджелудочной железы экспериментальных животных, в условных единицах

ИПК	Экспериментальная группа			
	Интактная	Сахарный диабет 2 типа (СД2):		
		30 суток	60 суток	60 суток + АФГ
ОП одиночных ИПК				
В составе ацинусов	0,43 ± 0,04	0,41 ± 0,03	0,36 ± 0,02	0,5 ± 0,05 ³
В эпителии протоков	0,44 ± 0,04	0,39 ± 0,02	0,35 ± 0,05	0,69 ± 0,07 ^{1; 2; 3}
ОП ИПК в группах				
В составе ацинусов	0,45 ± 0,01	0,43 ± 0,02	0,36 ± 0,02 ^{1;2}	0,55 ± 0,03 ^{1; 2; 3}
В эпителии протоков	0,44 ± 0,02	0,44 ± 0,06	0,44 ± 0,03	0,58 ± 0,02 ^{1; 2; 3}
ОП эндокриноцитов в островках Лангерганса				
В β-клетках	0,41 ± 0,02	0,38 ± 0,03	0,35 ± 0,02 ¹	0,53 ± 0,08 ^{1; 2; 3}

Примечание: ¹ – $p < 0,05$ в сравнении с интактной группой; ² – $p < 0,05$ в сравнении с группой СД2 продолжительностью 30 суток; ³ – $p < 0,05$ в сравнении с группой СД2 продолжительностью 60 суток; АФГ – аминифалгидразид натрия.

3.2 – Внеостровковые инсулин-позитивные клетки в поджелудочной железе крыс при экспериментальном сахарном диабете второго типа

При СД2 ряд факторов, среди которых, наряду с гиперлипидемией, гиперпротеинемией, отрицательным действием лептина и циркулирующих цитокинов центральное место занимает гипергликемия, способствует

нарушению функции β -клеток [192], что, в конечном итоге, приводит к нарушению выработки инсулина и снижению его количества в крови. В связи с этим, особый интерес представляет характер изменений количества и функциональной активности внеостровковых ИПК, которые, наряду с островковыми инсулин-продуцирующими клетками, являются источником инсулина, при развитии СД2.

3.2.1 – Оценка биохимических показателей крови крыс при развитии экспериментального сахарного диабета второго типа

При развитии экспериментального СД2 уровень глюкозы в крови экспериментальных животных достоверно увеличивается по сравнению с контролем ($5,12 \pm 0,18$ ммоль/л) и достигает $12,86 \pm 1,09$ ммоль/л и $12,44 \pm 0,26$ ммоль/л к 30-м и 60-м суткам развития диабета соответственно. Относительное содержание гликированного гемоглобина в плазме крови достоверно возрастает по сравнению с контролем к 30-м суткам развития СД2 и сохраняется на этом уровне в течение следующего месяца (таблица 12).

Таблица 12 – Содержание глюкозы и гликированного гемоглобина (HbA_{1c}) в крови экспериментальных животных

Исследуемый параметр	Экспериментальная группа			
	Интактная группа	Сахарный диабет 2 типа (СД2):		
		30 суток	60 суток	60 суток + АФГ
Содержание глюкозы, ммоль/л	$5,12 \pm 0,18$	$12,86 \pm 1,09$ 1; 2	$12,44 \pm 0,26$ 1; 2	$7,18 \pm 0,19$
Относительное содержание HbA _{1c} , %	$4,33 \pm 0,19$	$6,6 \pm 0,21$ ¹	$7,49 \pm 0,52$ ^{1; 2}	$5,81 \pm 0,31$

Примечание: ¹ – $p < 0,05$ в сравнении с интактной группой; ² – $p < 0,05$ в сравнении с группой СД2 продолжительностью 60 суток + АФГ; АФГ – аминофталгидразид натрия.

К 60-м суткам от начала эксперимента содержание инсулина в плазме крови экспериментальных крыс составляло $15,19 \pm 0,46$ мМЕ/мл, что

достоверно ниже, чем в группе интактных животных, у которых оно равнялось $22,08 \pm 1,85$ мМЕ/мл (*таблица 13*).

Известно, что в развитии диабета большую роль играют контринсулярные гормоны [17, 97], центральное место среди которых у крыс занимает глюкокортикоидный гормон кортикостерон. Действие контринсулярных гормонов приводит к усилению глюконеогенеза и снижению чувствительности тканей к инсулину [128, 183]. Содержание кортикостерона в крови экспериментальных животных представлено в *таблице 13*.

Иммуноферментное исследование плазмы крови экспериментальных крыс не показало изменений в содержания кортикостерона у крыс с СД2, что может быть связано с умеренной выраженности гипергликемии при развившемся экспериментальном СД2 (*таблица 13*).

Таблица 13 – Содержание инсулина и кортикостерона в крови экспериментальных животных

Содержание в крови	Экспериментальная группа			
	Интактная	Сахарный диабет 2 типа (СД2):		
		30 суток	60 суток	60 суток + АФГ
Инсулин, мМЕ/мл	$22,08 \pm 1,85$	$16,94 \pm 0,89$ ²	$15,19 \pm 0,46$ ^{1; 2}	$19,56 \pm 0,18$
Кортикостерон, пг/мл	$135,75 \pm 3,12$	$151,75 \pm 7,03$	$135,60 \pm 6,04$	$143,98 \pm 5,00$

Примечание: ¹ – $p < 0,05$ в сравнении с интактной группой; ² – $p < 0,05$ в сравнении с группой СД2 продолжительностью 60 суток + АФГ; АФГ – аминофталгидразид натрия.

Повышенное количество лейкоцитов в крови в обеих группах крыс с экспериментальным диабетом свидетельствует в пользу развития воспалительных реакций в организме и может быть объяснено рекрутированием лейкоцитов в место повреждения вследствие повреждения клеток и тканей (*таблица 14*).

Таким образом, полученный в работе экспериментальный СД2 характеризовался стойкой умеренной гипергликемией, подтверждаемой достоверным увеличением содержания гликированного гемоглобина и снижением количества инсулина. Повышенное количество лейкоцитов в крови свидетельствовало о развитии в организме животных воспалительных реакций.

Таблица 14 – Количество лейкоцитов в крови экспериментальных животных

Исследуемый параметр	Экспериментальная группа			
	Интактная	Сахарный диабет 2 типа (СД2):		
		30 суток	60 суток	60 суток + АФГ
Количество лейкоцитов, тыс/мкл	10,76 ± 0,79	17,62 ± 1,86 ¹	15,68 ± 1,24 ^{1; 2}	6,72 ± 1,6 ¹

Примечание: ¹ – $p < 0,05$ в сравнении с интактной группой; ² – $p < 0,05$ в сравнении с группой СД2 продолжительностью 60 суток + АФГ; АФГ – аминофталгидразид натрия.

3.2.2 – Содержание внеостровковых инсулин-позитивных клеток в поджелудочной железе крыс при развитии экспериментального сахарного диабета второго типа

Иммуногистохимическое исследование поджелудочной железы с использованием антител к проинсулину и инсулину показало снижение общего количества ИПК в поджелудочной железе у животных с СД2 по сравнению с интактными (таблица 7). Снижение количества внеостровковых ИПК, которое можно охарактеризовать как плавное и пропорциональное и в ацинарной, и в протоковой локализациях, наблюдалось к 60 суткам развития СД2 (таблица 8). Уменьшение количества внеостровковых ИПК на 60-е сутки СД2 происходило за счёт снижения их количества в малых группах, при этом количество одиночных внеостровковых ИПК в обеих локализациях не изменялось (таблица 8).

ИПК, располагающиеся в составе островков Лангерганса и вне их в паренхиме железы (в эпителии ацинусов и протоков), по-разному реагировали на развитие экспериментального СД2. Выраженная деструкция инсулин-продуцирующих клеток островкового аппарата при СД2 на фоне постепенного снижения количества внеостровковых ИПК привела к тому, что доля внеостровковых ИПК в общем количестве ИПК поджелудочной железы возросла и к 60 суткам СД2 составила около 10 % (таблица 7). Установлено, что наблюдаемое у интактных крыс преобладание количества ацинарных ИПК

над количеством протоковых ИПК (примерно 80 % / 20 %) сохранялось при обоих исследованных сроках диабета (*таблица 9*). Не выявлено закономерности изменений количества внеостровковых ИПК ацинарной и протоковой локализации в поджелудочной железе животных из диабетических групп.

Обращает на себя внимание увеличение количества ацинарных одиночных ИПК на 30-е сутки развития СД2. Рост количества одиночных ацинарных ИПК может трактоваться как компенсаторная репаративная реакция со стороны поджелудочной железы на развитие гипергликемии при диабете, не наблюдаемая на более позднем сроке развития диабета.

Таким образом, установлено, что по мере прогрессирования экспериментального СД2 количество внеостровковых ИПК равномерно снижалось и в ацинусах, и в эпителии протоков поджелудочной железы. Снижение общего количества внеостровковых ИПК поджелудочной железы происходило за счёт уменьшения количества клеток, расположенных малыми группами, в то время как количество одиночно лежащих внеостровковых ИПК в обеих исследуемых локализациях практически не изменялось. Наблюдаемое у интактных крыс количественное преобладание ацинарных внеостровковых ИПК над протоковых не менялось у животных с СД2.

3.2.3 – Морфологическая характеристика и оценка функциональной активности внеостровковых инсулин-позитивных клеток поджелудочной железы крыс при развитии экспериментального сахарного диабета второго типа

На размеры ИПК при СД2 оказывает большее влияние их локализация (ацинарная или протоковая), чем характер расположения (одиночно или в составе группы). Сохраняется выявленное у интактных крыс преобладание размеров одиночно расположенных ацинарных ИПК над одиночно расположенными протоковыми ИПК (*таблица 10*). Тем не менее, зависимость

размеров внеостровковых ИПК от характера расположения (одиночно или в составе групп) можно отметить в обеих локализациях. Обнаружено, что размеры одиночно расположенных ацинарных ИПК, увеличиваясь к 30 суткам СД2, к 60 суткам снижались и возвращались к интактным значениям. При этом к 30 суткам СД2 не наблюдалось достоверного роста размеров ацинарных ИПК в составе групп, а к 60 суткам происходило их снижение. Размеры одиночных протоковых ИПК демонстрировали стабильность и не менялись ни на 30-е, ни на 60-е сутки СД2, однако, при групповом расположении их размеры снижались к 30 суткам СД2 и восстанавливались до значений интактных крыс.

Функциональная активность ИПК, оцениваемая по оптической плотности цитоплазмы, на сроке СД2 30 суток осталась неизменной во всех внеостровковых ИПК вне зависимости от их локализации и характера расположения. По мере развития СД2 функциональная активность ИПК снижалась только в расположенных группами ацинарных ИПК (*таблица 11*). Таким образом, особенности изменения размеров и функциональной активности ИПК при СД2 зависят от их локализации. ИПК протоковой локализации демонстрируют большую стабильность морфофункциональных характеристик, чем ИПК ацинарной локализации.

Резюме

При иммуногистохимическом исследовании срезов поджелудочной железы с применением антител к инсулину и проинсулину установлено наличие инсулин-позитивных клеток (ИПК) вне островков Лангерганса как у интактных животных, так и у животных с экспериментальным СД2. ИПК могут располагаться одиночно или в составе групп в эпителии ацинусов и протоков поджелудочной железы. У интактных животных количество ИПК, расположенных вне островков, составляет около 3,5 % от общего количества ИПК в поджелудочной железе, причём большая их часть (примерно 80 %) располагается в ацинусах железы. Размеры одиночных ИПК в составе ацинусов

почти в два раза больше, чем размеры одиночных ИПК в эпителии протоков. Размеры внеостровковых ИПК, собранных в группы, в разных локализациях одинаковы. Функциональная активность внеостровковых ИПК в поджелудочной железе интактных животных не зависит от их локализации (в составе ацинусов или в эпителии протоков) и характера расположения (одиночно или в составе группы).

По мере развития экспериментального СД2 общее количество внеостровковых ИПК в поджелудочной железе плавно и пропорционально снижается и в ацинусах, и в эпителии протоков, однако, морфофункциональные характеристики ИПК изменяются по-разному в зависимости от их локализации. Сохраняется отмеченное у интактных животных преобладание внеостровковых ИПК ацинарной локализации над протоковыми.

Если у интактных животных внеостровковые ИПК разных локализаций мало отличаются друг от друга по размерам и функциональной активности (исключением являются малые размеры одиночных протоковых внеостровковых ИПК), то на развитие СД2 ИПК ацинарной и протоковой локализации реагируют по-разному. У ацинарных ИПК при развитии СД2 плавно снижается функциональная активность и изменяются размеры (первоначальное увеличение размеров сопровождается их снижением с течением СД2), у протоковых ИПК изменений функциональной активности и характера изменения размеров не выявлено. Наибольшую стабильность при развитии СД2 демонстрируют одиночные протоковые ИПК: развитие СД2 не влияет ни на их размеры, ни на функциональную активность.

Учитывая тот факт, что снижение количества β -клеток островков Лангерганса при СД2 гораздо более выражено, чем количества внеостровковых ИПК, а также более быструю скорость развития повреждений ИПК в островках, чем вне их, можно предположить увеличение вклада внеостровковых ИПК в общую продукцию инсулина при СД2 по сравнению с таковым у интактных животных, связанное с тем, что внеостровковые ИПК подвергаются меньшим деструктивным изменениям, чем β -клетки панкреатических островков.

К числу компенсаторных процессов в инсулин-продуцирующей системе поджелудочной железы при экспериментальном СД2 можно отнести развитие гипертрофии внеостровковых ИПК ацинарной локализации и увеличение их количества, наблюдаемое на 30-е сутки развития СД2.

Список статей, опубликованных по материалам главы 3

1. Соколова, К.В. Проявление регенераторного потенциала внеостровковых инсулин-синтезирующих клеток поджелудочной железы в условиях экспериментального диабета 2 типа и при введении аминофталгидразида / 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).

2. 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**).

3. 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).

4. 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).

5. 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).

ГЛАВА 4 – МАКРОФАГИ В НЕЭНДОКРИННОЙ ЧАСТИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ ВТОРОГО ТИПА И ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ АМИНОФТАЛГИДРАЗИДОМ НАТРИЯ

4.1 – Макрофаги в неэндокринной части поджелудочной железы

Макрофаги присутствуют во всех тканях организма, способствуя поддержанию гомеостаза и активируя иммунный ответ на повреждающие раздражители. Макрофаги представляют собой гетерогенную клеточную популяцию. Для идентификации макрофагов используют белки, экспрессируемые на их поверхности, такие, как F4/80, CD 68, CD 163 и ряд других [82, 149, 191]. Маркер F4/80 специфичен для макрофагов поджелудочной железы [58, 121]. При повреждениях количество макрофагов в тканях возрастает за счёт рекрутирования циркулирующих моноцитов, дифференцирующихся в макрофаги [95, 157]. Количество макрофагов, инфильтрирующих островки Лангерганса поджелудочной железы, при СД2, увеличивается [213]. Макрофаги нарушают функцию β -клеток при СД2, а их подавление улучшает секрецию инсулина и толерантность к глюкозе [247].

4.1.1 – Оценка содержания макрофагов в неэндокринной части поджелудочной железы интактных крыс и крыс с экспериментальным сахарным диабетом второго типа

Содержание макрофагов в неэндокринной части поджелудочной железы оценивали по количеству F4/80-позитивных клеток, локализованных в ацинусах железы и в эпителии протоков (*рисунок 5*). Выявлены различия в количестве макрофагов между ацинарной частью железы и эпителием протоков как у интактных крыс, так и у крыс с СД2. У интактных животных большая часть макрофагов в неэндокринной части поджелудочной железы ($70,11 \pm 6,97$

%) находится в протоках, а меньшая часть – в ацинусах ($29,89 \pm 6,97$ %). При развитии экспериментального СД2 общее количество макрофагов в паренхиме неэндокринной части поджелудочной железы не изменялось, но наблюдалось перераспределение макрофагов между ацинусами и протоками железы. При этом макрофагальная инфильтрация ацинарной части железы увеличивалась, а количество макрофагов в эпителии протоков снижалось, причём с увеличением срока СД2 распределение макрофагов в паренхиме железы демонстрировало ещё более выраженный уклон в сторону ацинарной локализации ($82,5 \pm 7,83$ % от всех макрофагов в неэндокринной части поджелудочной железы против $17,5 \pm 7,83$ % в протоках к 60-м суткам развития СД2) (таблица 15).

Таблица 15 – Количество макрофагов (F4/80-позитивных клеток) в неэндокринной части поджелудочной железы экспериментальных животных

Исследуемый параметр	Экспериментальная группа			
	Интактная	Сахарный диабет 2 типа (СД2):		
		30 суток	60 суток	60 суток + АФГ
Общее количество, штук на мм ² паренхимы железы	$87,45 \pm 6,49$	$116,52 \pm 12,97$	$113,07 \pm 11,97^2$	$42,42 \pm 5,33^1$
из них:				
В составе ацинусов	$26,45 \pm 6,28^4$	$90,3 \pm 17,29_{1;4}$	$97,97 \pm 18,72_{1;2;4}$	$16,39 \pm 3,41$
В эпителии протоков	$61,00 \pm 6,3$	$26,22 \pm 5,02^1$	$15,1 \pm 6,76_{3;1;2}$	$26,03 \pm 2,08^1$
Доля макрофагов в локализации 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: ¹ – $p < 0,05$ в сравнении с интактной группой; ² – $p < 0,05$ в сравнении с группой СД2 продолжительностью 60 суток + АФГ; ³ – $p < 0,05$ в сравнении с группой СД2 продолжительностью 30 суток; ⁴ – $p < 0,05$ в сравнении с количеством макрофагов в эпителии протоков внутри одной экспериментальной группы; АФГ – аминофталгидразид натрия.

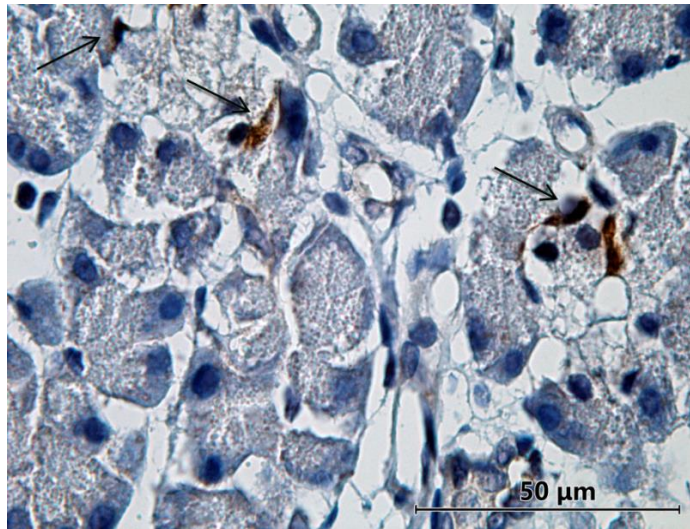


Рисунок 5 – Макрофаги в неэндокринной части поджелудочной железы крысы

Примечание: иммуногистохимическое окрашивание среза поджелудочной железы с использованием антител к макрофагальному маркеру F4/80, контрастное докрашивание гематоксилином. Цитоплазма F4/80-позитивных клеток имеет коричневое окрашивание. Стрелками показаны макрофаги. Увеличение x 1000.

4.1.2 – Оценка содержания макрофагов в неэндокринной части поджелудочной железы крыс при воздействии аминофталгидразидом натрия

Воздействие на функциональную активность макрофагов аминофталгидразидом натрия (АФГ) у крыс с экспериментальным СД2 приводило к снижению общего количества макрофагов в неэндокринной части паренхимы поджелудочной железы более чем в 2,5 раза, причём оно достигалось за счёт снижения количества макрофагов в ацинарной части железы. В эпителии протоков количество макрофагов по сравнению с аналогичным сроком СД2, напротив, возрастало. При этом количественное соотношение макрофагов в ацинусах и протоках сдвигалось в сторону значений, характерных для интактных крыс: $63,03 \pm 3,71$ % от всех макрофагов в неэндокринной части железы локализовано в протоках и $36,97 \pm 3,71$ % – в ацинусах при показателях в интактной группе в $70,11 \pm 6,97$ % и $29,89 \pm 6,97$ % соответственно (таблица 15). Макрофаги распределялись в паренхиме

поджелудочной железы более равномерно, отличия между количеством макрофагов в ацинусах и в эпителии протоков железы перестали быть достоверными.

Таким образом, введение АФГ влияло на макрофаги поджелудочной железы, что проявлялось, во-первых, снижением их общего количества, а, во-вторых, перераспределением в паренхиме неэндокринной части, которое приводило к уменьшению макрофагальной инфильтрации ацинусов. Соотношение между числом макрофагов в ацинусах и протоках железы возвращалось к уровню, наблюдаемому у интактных животных, при котором примерно 30-35 % макрофагов неэндокринной части поджелудочной железы локализованы в ацинусах, а 65-70 % – в эпителии протоков.

4.2 – Исследование функциональной активности макрофагов

Многие функции макрофагов определяются теми цитокинами и биологически активными веществами, которые они синтезируют и секретируют. Известно, что персистирующее воспаление, поддерживаемое за счёт продуцируемых макрофагами провоспалительных цитокинов, сопровождает развитие СД2 [206]. Установлена зависимость между риском развития СД2 и повышенным уровнем провоспалительных цитокинов, таких, как IL-1 β , IL-6, TNF- α [38, 44, 117].

4.2.1 – Оценка функциональной активности макрофагов в крови и в поджелудочной железе интактных крыс и крыс с экспериментальным сахарным диабетом второго типа

Известно, что макрофаги, в зависимости от типа активации, регулируют как пролиферацию β -клеток, так и их гибель при СД2 [112, 113, 174]. Для оценки функциональной активности макрофагов были выбраны цитокины, с

одной стороны, связанные с развитием хронического воспаления и СД2, а, с другой стороны, такие, с помощью которых макрофаги могут влиять на функционирование и пролиферацию островковых β -клеток.

При СД2 содержание цитокинов менялось как в крови, так и локально в ткани поджелудочной железы. В крови крыс с диабетом наблюдалось увеличение концентрации провоспалительных цитокинов и снижение концентрации противовоспалительного цитокина TGF- β 1 (*таблица 16*). К 60-м суткам СД2 концентрация IFN- γ в крови возрастала почти в пять раз. Известно, что IFN- γ способствует поляризации макрофагов в сторону M1, характеризующуюся выработкой провоспалительных цитокинов и приводящих к развитию воспалительных реакций в тканях, в частности, в поджелудочной железе. Об усилении воспалительных процессов в организме также свидетельствовали рост содержания TNF- α , продукция которого характерна для M1 макрофагов (*таблица 16*), и упомянутое ранее увеличение числа лейкоцитов в крови (*таблица 12*).

Таблица 16 – Содержание TNF- α , IFN- γ и TGF- β 1 в крови и поджелудочной железе экспериментальных животных, пг/мл

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

Примечание: ¹ – $p < 0,05$ в сравнении с интактной группой; ² – $p < 0,05$ в сравнении с группой СД2 продолжительностью 60 суток + АФГ; TNF- α – фактор некроза опухоли альфа; IFN- γ – интерферон гамма; TGF- β 1 – трансформирующий фактор роста бета 1; АФГ – аминифталгидразид натрия.

Изменение цитокиновой продукции определяет развитие воспалительных реакций в поджелудочной железе. Концентрация противовоспалительного

цитокина TGF- β 1, связанного с дифференцировкой панкреоцитов в инсулин-продуцирующие, снижалась на обоих исследованных сроках СД2 (*таблица 16*).

4.2.2 – Оценка функциональной активности макрофагов в поджелудочной железе и в крови при воздействии аминифталгидразидом натрия

При введении АФГ крысам с СД2, целью которого было изменение функциональной активности макрофагов, в крови животных было отмечено уменьшение концентрации провоспалительного цитокина IFN- γ , увеличение концентрации противовоспалительного цитокина TGF- β 1 (*таблица 16*) и уменьшение общего количества лейкоцитов в крови (*таблица 12*).

Воздействие на функциональную активность макрофагов АФГ крыс с экспериментальным СД2 приводило к снижению содержания в ткани поджелудочной железы TNF- α и увеличению содержания TGF- β 1, цитокина, связанного с дифференцировкой клеток железы в инсулин-продуцирующие (*таблица 16*). Известно, что макрофаги поджелудочной железы продуцируют TGF- β 1 в ответ на повреждение β -клеток островка, что активирует их пролиферацию [14, 101, 103]. Полученные данные об увеличении концентрации TGF- β 1 в ткани поджелудочной железы при модуляции активности макрофагов, рассматриваемые совместно с данными по количеству ИПК в составе ацинусов и эпителии протоков, позволяют предположить влияние макрофагов на образование инсулин-продуцирующих клеток за пределами островков Лангерганса посредством усиления продукции TGF- β 1.

Не выявлено влияния модуляции активности макрофагов АФГ на содержание TNF- α в крови. Известно, что TNF- α ингибирует передачу сигнала в инсулиновых рецепторах [260], а увеличение продукции этого цитокина связано с развитием инсулинорезистентности. На фоне отсутствия изменений концентрации TNF- α при введении АФГ представляет интерес факт снижения значения индекса HOMA-IR у крыс в данной экспериментальной группе.

Вероятно, это свидетельствует о том, что снижение показателя индекса НОМА-IR происходит за счёт увеличения выработки инсулина клетками поджелудочной железы и нормализации гипергликемии. Модуляция активности макрофагов полностью не устраняет воспалительный процесс, наличие которого подтверждает продолжающееся оставаться высоким содержание TNF- α в крови, но, за счёт благотворного воздействия на инсулин-продуцирующие клетки, в том числе внеостровковые ИПК поджелудочной железы, адекватность инсулинового ответа на высокое содержание глюкозы в крови повышается. Концентрация инсулина в крови растёт, а интенсивность гипергликемии, напротив, снижается.

Не выявлено статистически значимого влияния модуляции активности макрофагов на содержание IFN- γ в ткани поджелудочной железы.

Резюме

У крыс с СД2 распределение макрофагов в паренхиме поджелудочной железы и их продукция существенно отличаются от таковых у интактных крыс. В поджелудочной железе интактных животных макрофаги локализованы, в основном, в протоках, при этом их количество в эпителии протоков более чем в 2 раза превышает таковое в составе ацинусов. При СД2 общее количество макрофагов в поджелудочной железе достоверно не изменяется, но происходит их перераспределение в паренхиме неэндокринной части железы, вследствие чего возрастает макрофагальная инфильтрация ацинусов, что, вероятно, ведёт к повышению уровня воспаления в них, поскольку инфильтрация тканей M1 макрофагами приводит к развитию воспалительной реакции в органах [118, 296]. IFN- γ входит в число множества факторов, меняющих поляризацию макрофагов в сторону M1. Именно с присутствием M1 макрофагов связано увеличение концентрации TNF- α в крови и снижение концентрации TGF- β 1 в ткани поджелудочной железы.

При воздействии АФГ изменяются продукция и количество макрофагов, инфильтрующих поджелудочную железу. Выявлено изменение содержания провоспалительных и противовоспалительных цитокинов и в крови, и в ткани железы. Иммуногистохимическое исследование ткани железы показывает снижение общего количества макрофагов в паренхиме органа за счёт снижения макрофагальной инфильтрации ацинусов, при этом количество макрофагов в эпителии протоков возрастает по сравнению с СД2. Снижение количества макрофагов в ацинарной части паренхимы железы приводит к восстановлению их соотношения в ацинусах и протоках железы, характерному для физиологически интактных животных. Изменение содержания цитокинов в крови и поджелудочной железе позволяет предположить ослабление воспалительных реакций в ткани железы.

Существующие данные об участии белка F4/80 в образовании эфферентных регуляторных Т-клеток [272], позволяющие предположить вовлечённость F4/80-позитивных макрофагов в развитие воспалительных реакций, а сам F4/80 трактовать как маркер M1 макрофагов, хорошо согласуются с изменением макрофагальной продукции в сторону M1, наблюдаемой в ткани железы при СД2 на фоне усиления макрофагальной инфильтрации ацинусов.

Список статей, опубликованных по материалам главы 4

1. 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).

2. 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**).

ГЛАВА 5 –ВНЕОСТРОВКОВЫЕ ИНСУЛИН-ПОЗИТИВНЫЕ КЛЕТКИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ИЗМЕНЕНИИ АКТИВНОСТИ МАКРОФАГОВ АМИНОФТАЛГИДРАЗИДОМ НАТРИЯ

Известно, что макрофаги играют важную роль как в пролиферации и восстановлении, так и в разрушении β -клеток, причём, именно функциональная активность макрофагов определяет результат их взаимодействия с β -клетками [174]. Известно, что повышенная секреция макрофагами, инфильтрирующими поджелудочную железу, провоспалительных цитокинов, в частности, TNF- α и IFN- γ , нарушает функцию β -клеток при СД1 и СД2 [213]. Напротив, модуляция активности макрофагов введением АФГ увеличивает количество β -клеток в модели СД1 [224]. Влияние секретируемых макрофагами факторов на функциональную массу островковых β -клеток позволяет предположить то, что они могут воздействовать и на внеостровковые ИПК поджелудочной железы.

Для изучения механизмов макрофагальной регуляции образования и функционирования внеостровковых ИПК поджелудочной железы представляется целесообразным оценить количество внеостровковых ИПК разной локализации, их размеры и функциональную активность, при изменении активности макрофагов.

5.1 – Содержание внеостровковых инсулин-позитивных клеток различных локализаций при изменении активности макрофагов

Модуляция активности макрофагов у крыс с СД2 введением АФГ приводила к увеличению количества внеостровковых ИПК в паренхиме железы, причём число ИПК возрастало не только по сравнению со значениями у крыс с СД2, но и по сравнению с показателями интактных животных. Общее количество ИПК в составе ацинусов повышалось по сравнению с интактной группой почти в 3 раза (с $2,8 \pm 0,37$ до $8,23 \pm 1,71$ клеток на мм^2 паренхимы железы), а по сравнению с аналогичным сроком СД2 без воздействия на

функциональную активность макрофагов – более чем в 4 раза (с $1,86 \pm 0,43$ клеток на мм^2 паренхимы железы) (*таблица 8*). При этом по сравнению с группой с СД2 количество одиночно расположенных ИПК в составе ацинусов возрастало приблизительно в 6-7 раз, а количество ацинарных ИПК в составе групп – в 3-4 раза.

Рост общего количества ИПК в эпителии протоков составил примерно 2,5 раза (с $0,71 \pm 0,24$ до $1,74 \pm 0,24$ клеток на мм^2 паренхимы железы) по сравнению с интактной группой и 6,5 раз (с $0,28 \pm 0,12$ клеток на мм^2 паренхимы железы) по сравнению со значениями в диабетной группе. По сравнению с диабетными значениями количество одиночных протоковых ИПК возросло в 6-7 раз, а объединённых в группы – почти в 13.

Соотношение ацинарных и протоковых ИПК было примерно одинаково во всех экспериментальных группах: в ацинусах железы ИПК в 3-4 раза больше, чем в эпителии протоков (*таблица 9*), модуляция функциональной активности макрофагов не изменяла это соотношение.

5.2 – Оценка размеров и функциональной активности внеостровковых инсулин-позитивных клеток поджелудочной железы при изменении активности макрофагов

Введение АФГ по-разному влияло на размеры внеостровковых ИПК в зависимости от того, расположены они в паренхиме поджелудочной железы одиночно или в составе групп. Площадь одиночных внеостровковых ИПК не менялась ни по сравнению со значениями в группе с аналогичным сроком СД2, ни по сравнению с интактными значениями (*таблица 10*). ИПК в составе групп в обеих локализациях были мельче, чем у интактных животных. Кроме того, ИПК в эпителии протоков при воздействии на функциональную активность макрофагов становились мельче, чем при СД2.

Оптическая плотность цитоплазмы внеостровковых ИПК при введении АФГ увеличивалась по сравнению с группой с аналогичным сроком СД2 в

обеих исследованных локализациях (в составе ацинусов и в эпителии протоков) вне зависимости от того, были расположены ИПК одиночно или в составе группы (*таблица 11*). В сравнении с интактной группой, значение оптической плотности цитоплазмы возрастало во всех исследованных типах внеостровковых ИПК, за исключением одиночно расположенных ацинарных.

5.3 – Оценка биохимических показателей крови при изменении активности макрофагов

Модуляция функциональной активности макрофагов введением АФГ оказывает выраженное воздействие на внеостровковые ИПК поджелудочной железы. В контексте важности изучения данного вопроса для возможности теоретического обоснования новых терапевтических подходов к лечению СД2 необходимо было не просто определить количество и морфофункциональные характеристики внеостровковых ИПК, но и оценить их возможное влияние на основные биохимические показатели крови при СД2.

Проведённое при СД2 воздействие на активность макрофагов приводило к снижению концентрации глюкозы в плазме крови с $12,44 \pm 0,26$ ммоль/л до $7,18 \pm 0,19$ ммоль/л (*таблица 10*). Понижение относительного содержания гликированного гемоглобина в крови, отражающего концентрацию глюкозы на протяжении длительного периода, с $7,49 \pm 0,52$ % при СД2 до $5,81 \pm 0,31$ % свидетельствовало о стабильности снижения уровня глюкозы под действием АФГ.

Что касается содержания инсулина в крови экспериментальных животных, то на фоне воздействия на функциональную активность макрофагов наблюдалось его повышение до значений, статистически неотличимых от таковых в интактной группе ($19,56 \pm 0,18$ мМЕ/мл и $22,08 \pm 1,85$ мМЕ/мл соответственно при показателе $15,19 \pm 0,46$ мМЕ/мл в группе с СД2).

Показатель индекса НОМА-IR снижался с $8,39 \pm 0,23$ на 60-е сутки экспериментального СД2 до $6,24 \pm 0,2$ при аналогичном сроке СД2 на фоне модуляции активности макрофагов (таблицы 4, 10, 11).

Таким образом, нормализация инсулинемии и ослабление гипергликемии, наблюдаемые при воздействии на функциональное состояние макрофагов, хорошо согласуются с увеличением количества и функциональной активности внеостровковых ИПК и, отчасти, могут быть их следствием.

Резюме

Воздействие на функциональную активность макрофагов у крыс с СД2 введением аминоталгидразида натрия оказывало влияние как на биохимические показатели крови, так и на образование и функционирование внеостровковых ИПК поджелудочной железы.

Введение АФГ экспериментальным животным приводило к стойкому снижению уровня гипергликемии при СД2, подтверждаемому уменьшением относительного содержания гликированного гемоглобина в крови. Концентрация инсулина в крови увеличивалась. Значение индекса НОМА-IR, используемого для количественной оценки резистентности периферических тканей к инсулину, снижалось. Снижение показателя НОМА-IR при сохранении высокого уровня содержания TNF- α в плазме крови хорошо соотносится с ростом количества внеостровковых ИПК. Таким образом, можно предположить благотворное влияние со стороны внеостровковых ИПК на биохимические показатели крови при СД2.

Со стороны внеостровковых ИПК наблюдалась выраженная реакция на модуляцию активности макрофагов, инвариантная их локализации (в ацинусах или в эпителии протоков) и характеру расположения в паренхиме железы (одиночно или в составе группы). Происходило увеличение количества и функциональной активности всех видов внеостровковых ИПК не только по сравнению с аналогичными показателями у животных с СД2, но и по сравнению

с интактными животными. Увеличение числа ИПК не приводило к изменению баланса между субпопуляциями внеостровковых ИПК.

Различия в размерах ИПК разных локализаций сохранялись: средняя площадь ацинарных ИПК была больше, чем у протоковых, вне зависимости от характера их расположения (одиночно или в составе группы). Размеры ИПК в составе групп снижались вне зависимости от их локализации в поджелудочной железе, что можно объяснить увеличением скорости образования новых ИПК и ростом количества ИПК в составе групп.

Таким образом, изменение активности макрофагов при введении АФГ оказывало воздействие на образование и функционирование внеостровковых ИПК поджелудочной железы. Воздействие на макрофаги увеличивало общее количество и функциональную активность внеостровковых ИПК, но не меняло соотношение между субпопуляциями, сохраняя численное преобладание ацинарных ИПК над протоковыми.

Список статей, опубликованных по материалам главы 5

1. 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).

2. 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**).

3. Соколова, К.В. Проявление регенераторного потенциала внеостровковых инсулин-синтезирующих клеток поджелудочной железы в условиях экспериментального диабета 2 типа и при введении аминфталгидразида / 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).

4. 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**).

5. 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).

6. 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).

7. 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).

8. 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).

ГЛАВА 6 – МЕХАНИЗМЫ МАКРОФАГАЛЬНОЙ РЕГУЛЯЦИИ ОБРАЗОВАНИЯ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ВНЕОСТРОВКОВЫХ ИНСУЛИН-ПОЗИТИВНЫХ КЛЕТОК ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Макрофаги, инфильтрирующие зону повреждения, усиливают регенерацию за счёт изменения синтеза и секреции веществ, выступающих в роли сигнальных молекул, которые могут, с одной стороны, влиять непосредственно на клетки ткани, а, с другой стороны, привлекать в ткань стволовые клетки из костного мозга.

6.1 – Оценка содержания транскрипционного фактора Pdx1 в неэндокринной части поджелудочной железы

Показано, что дедифференцировка неэндокринных клеток поджелудочной железы в ИПК находится в тесной зависимости от содержания транскрипционных факторов Pdx1, Ngn3 и MafA, среди которых решающую роль играет Pdx1, и выраженности воспалительной реакции в ткани железы [189, 221]. Полагают, что образование новых ИПК в поджелудочной железе возможно лишь при соблюдении двух условий: количество Pdx1 в клетках должен быть достаточно высоким, а уровень воспаления в железе, напротив, низким [189]. Для выявления механизмов воздействия макрофагов на внеостровковые ИПК представляется целесообразным оценить влияние количества и функциональной активности макрофагов на содержание транскрипционного фактора Pdx1 в неэндокринных клетках железы.

6.1.1 – Содержание транскрипционного фактора Pdx1 в неэндокринной части поджелудочной железы intactных крыс и крыс с экспериментальным сахарным диабетом второго типа

У intactных крыс количество клеток, содержащих транскрипционный фактор Pdx1 (Pdx1-позитивные клетки), в островках Лангерганса в 7-13 раз выше, чем в неэндокринной части поджелудочной железы (*таблица 17*). Это согласуется с тем, что подавляющая часть инсулин-продуцирующих клеток расположена именно в островках (*таблица 7*). В неэндокринной части паренхимы железы количество Pdx1-позитивных клеток невелико (*рисунок 6*), их количество в составе ацинусов и в эпителии протоков примерно одинаково.

По мере развития экспериментального СД2 количество Pdx1-позитивных клеток снижалось как в островках Лангерганса, так и в неэндокринной части поджелудочной железы, при этом статистически выраженное отличие от intactных животных наблюдалось в ацинусах железы на 60-е сутки СД2, а в эпителии протоков на 30-е сутки (*таблица 17*).

Таблица 17 – Количество Pdx1-позитивных клеток в поджелудочной железе экспериментальных животных, штук на мм^2 паренхимы

Исследуемый параметр	Экспериментальные группы			
	Intactная	Сахарный диабет 2 типа (СД2):		
		30 суток	60 суток	60 суток + АФГ
В островках Лангерганса	$269,19 \pm 37,97$	$193,55 \pm 36,2$	$184,85 \pm 22,1$ ^{1; 2}	$241,29 \pm 28,71$
В составе ацинусов	$34,19 \pm 7,59$	$26,89 \pm 3,55$ ²	$20,8 \pm 3,92$ ^{1; 2}	$58,73 \pm 19,53$
В эпителии протоков	$20,48 \pm 4,11$	$16,19 \pm 3,86$ ^{1; 2}	$17,24 \pm 2,5$ ²	$32,00 \pm 3,34$

Примечание: ¹ – $p < 0,05$ в сравнении с intactной группой; ² – $p < 0,05$ в сравнении с группой СД2 продолжительностью 60 суток + АФГ; Pdx1 – транскрипционный фактор; АФГ – аминоталгидразид натрия.

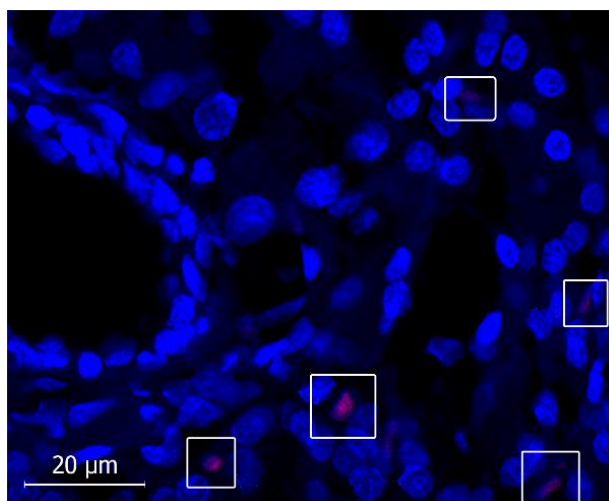


Рисунок 6 – Pdx1-позитивные клетки в неэндокринной части поджелудочной железы крысы

Примечание: Иммуногистохимическое окрашивание среза поджелудочной железы с использованием антител к транскрипционному фактору Pdx1 и иммуноглобулинов, конъюгированных с флуоресцентным красителем Texas Red, ядра докрашены красителем DAPI. Pdx1-позитивные клетки обведены рамкой. Увеличение $\times 400$

6.1.2 – Содержание транскрипционного фактора Pdx1 в неэндокринной части поджелудочной железы крыс при изменении активности макрофагов

После проведения курса АФГ как в островках, так и в эпителии неэндокринной части поджелудочной железы наблюдалось увеличение количества Pdx1-позитивных клеток, в результате чего их количество в составе ацинусов и в эпителии протоков железы возросло по сравнению со значениями в группе с СД2 продолжительностью 60 суток в 2,5-3 и 1,5-2 раза соответственно (*таблица 17*). Число Pdx1-позитивных островковых клеток увеличилось менее, чем в полтора раза.

Таким образом, модуляция функциональной активности макрофагов в условиях СД2 оказывала влияние на количество Pdx1-позитивных клеток в неэндокринной части железы, причём это воздействие было более выражено в ацинусах.

6.2 - Оценка содержания фактора стволовой клетки в крови и поджелудочной железе

В настоящее время исследователей привлекает возможность образования клеток, продуцирующих инсулин, из стволовых клеток взрослого организма. Плюрипотентные стволовые клетки, происходящие из костного мозга, являются одним из вероятных источников неогенеза островков поджелудочной железы [185]. Фактор стволовой клетки (stem cell factor, SCF, лиганд c-kit) – цитокин, относящийся к факторам роста, регулирующим процессы пролиферации и дифференциации клеток. Он запускает свои биологические эффекты, связываясь с тирозинкиназным рецептором c-kit (CD117), экспрессируемом на поверхности гемопоэтических стволовых клеток, а также некоторых других клеток [115]. Макрофаги являются одним из основных источников SCF. Известно, что взаимодействие c-kit/SCF влияет на образование инсулин-позитивных клеток из клеток-предшественников, локализованных в протоках поджелудочной железы [90].

6.2.1 – Содержание фактора стволовой клетки в крови и поджелудочной железе крыс с экспериментальным сахарным диабетом второго типа

Методом иммуноферментного анализа была определена концентрация SCF в плазме крови и ткани поджелудочной железы экспериментальных животных (*таблица 18*).

Установлено, что к 60-м суткам экспериментального СД2 содержание SCF и в плазме крови, и в ткани поджелудочной железы было примерно в полтора раза выше, чем у интактных крыс. При этом по мере развития СД2 концентрация SCF в крови увеличивалась постепенно и составляла $118,31 \pm 3,86$ пг/мл к 30-м суткам и $123,61 \pm 8,05$ пг/мл к 60-м суткам при контрольных значениях в $95,16 \pm 7,13$ пг/мл, а в ткани железы концентрация SCF на 30-е

сутки развития СД2 выше, чем на 60-е ($627,47 \pm 25,32$ пг/мл и $456,04 \pm 40,6$ пг/мл соответственно).

Таблица 18 – Концентрация фактора стволовой клетки (SCF) в крови и поджелудочной железе экспериментальных животных и количество клеток, экспрессирующих маркер c-kit (c-kit⁺ клетки), в неэндокринной части поджелудочной железы (ПЖ) экспериментальных животных

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

Примечание: ¹ – $p < 0,05$ в сравнении с интактной группой; ² – $p < 0,05$ в сравнении с группой СД2 продолжительностью 60 суток; АФГ – аминофталгидразид натрия.

6.2.2 - Содержание фактора стволовой клетки в крови и поджелудочной железе крыс при изменении активности макрофагов

В крови крыс с СД2 концентрация SCF при введении АФГ не изменялась. Напротив, в ткани поджелудочной железы воздействие на функциональную активность макрофагов вызывало почти полуторакратное увеличение концентрации SCF относительно группы с аналогичной продолжительностью диабета. При этом содержание SCF в крови и железе, наблюдаемое при модуляции активности макрофагов, было выше, чем в интактной группе (таблица 18).

Таким образом, модуляция активности макрофагов АФГ по-разному влияла на содержание SCF в плазме крови и в ткани поджелудочной железы крыс с СД2. Влияние функциональной активности макрофагов на содержание SCF было более выражено не на уровне всего организма, а локально в ткани железы, страдающей от развития СД2 и нуждающейся в регенерации.

6.3 – Оценка количества c-kit-позитивных клеток в неэндокринной части поджелудочной железы

Исследования показывают, что экспрессия c-kit в поджелудочной железе наблюдается в тех панкреоцитах, которые демонстрируют высокую пролиферативную способность и могут дать начало новым островковым β -клеткам. Известно, что c-kit управляет созреванием эндокринных клеток поджелудочной железы посредством множества сигнальных путей [128].

На основании результатов проведённого иммуногистохимического исследования срезов поджелудочной железы с использованием антител к c-kit можно сделать вывод о том, что у крыс Вистар в нормальных физиологических условиях рецепторы к фактору стволовой клетки присутствуют тотально на всех клетках островков Лангерганса (*рисунок 7*), при этом в ацинарной части железы наблюдались лишь отдельные клетки, позитивные к c-kit.

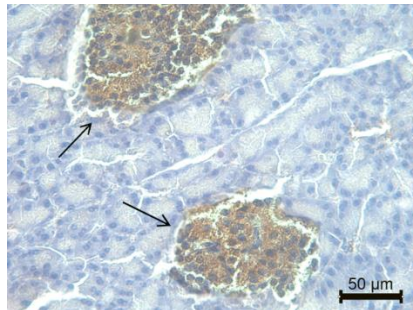


Рисунок 7 – С-kit-позитивные клетки в островках Лангерганса поджелудочной железы интактной крысы

Примечание: Иммуногистохимическое окрашивание среза поджелудочной железы крысы с применением антител к фактору стволовой клетки (c-kit), контрастное докрашивание гематоксилином. Цитоплазма c-kit-позитивных клеток имеет коричневое окрашивание. Стрелками показаны островки Лангерганса. Увеличение x400

6.3.1 - Оценка количества c-kit-позитивных клеток в неэндокринной части поджелудочной железы крыс с экспериментальным сахарным диабетом второго типа

К 30-м суткам развития СД2 в поджелудочной железе крыс наблюдалось более чем пятикратное уменьшение количества c-kit-позитивных неэндокринных клеток (с $22,64 \pm 4,87$ до $4,13 \pm 0,79$ клеток на мм^2 паренхимы железы), причём их количество не изменялось и по мере дальнейшего прогрессирования диабета, составляя к 60-м суткам развития СД2 $3,31 \pm 0,52$ клеток на мм^2 площади паренхимы (*таблица 18*).

6.3.2 – Оценка количества c-kit-позитивных клеток в неэндокринной части поджелудочной железы при изменении активности макрофагов

Не выявлено влияния модуляции активности макрофагов на количество c-kit-позитивных клеток в неэндокринной части поджелудочной железы (*таблица 18*). При введении АФГ в железе сохранялась присущая интактным и диабетным животным преимущественно островковая локализация c-kit-позитивных клеток.

Резюме

Проведённые исследования были направлены на выяснение возможной связи образования и функционирования внеостровковых ИПК поджелудочной железы с экспрессией в неэндокринных клетках железы, с одной стороны, транскрипционного фактора Pdx1 и, с другой стороны, рецептора к фактору стволовой клетки c-kit, а также концентрации его лиганда SCF в ткани железы.

У интактных крыс количество Pdx1-позитивных клеток в неэндокринной части поджелудочной железы было меньше, чем Pdx1-позитивных клеток в составе островков Лангерганса, что объясняется преимущественной

локализацией Pdx1 в тех клетках железы, которые секретируют гормоны, в частности, инсулин. Установлено, что число Pdx1-позитивных клеток в составе ацинусов и в эпителии протоков железы примерно одинаково. При развитии экспериментального СД2 количество клеток, экспрессирующих Pdx1, снижалось как в клетках островков Лангерганса, так и в клетках неэндокринной части железы. Наблюдаемое при введении АФГ усиление экспрессии Pdx1, являющегося общепризнанным маркером образования инсулин-продуцирующих клеток, свидетельствовало об усилении регенераторных процессов в железе.

Содержание SCF в крови и поджелудочной железе и количество клеток в паренхиме неэндокринной части железы, экспрессирующих рецептор к нему (c-kit), были определены для выявления возможного участия стволовых гематопоетических клеток в образовании внеостровковых ИПК поджелудочной железы. Увеличение содержания SCF в ткани железы при воздействии на функциональное состояние макрофагов у крыс с экспериментальным СД2 свидетельствует в пользу участия макрофагов в репаративных процессах в поджелудочной железе при СД2. Экспрессия рецептора к фактору стволовой клетки в неэндокринных панкреоцитах в нормальных физиологических условиях и при развитии СД2 была гораздо менее выражена, чем в островках, в которых она носит тотальный характер. Количество c-kit-позитивных клеток в неэндокринной части железы у крыс с СД2 было меньше, чем у интактных животных, при этом модуляция функциональной активности макрофагов не влияла на их количество. Снижение экспрессии c-kit могло быть вызвано деградацией рецепторов, запущенной повышенным количеством SCF, что, предположительно, является одним из механизмов ограничения эффектов SCF во время воспаления [64, 90].

Таким образом, регуляция образования и активности внеостровковых ИПК поджелудочной железы со стороны макрофагального звена может быть опосредована интенсивностью экспрессии транскрипционного фактора Pdx1 неэндокринными клетками железы. Факт увеличения концентрации SCF в

ткани железы при ведении АФГ указывает на то, что возможный репаративный ответ со стороны стволовых клеток до определённой степени также контролируется макрофагами.

Список статей, опубликованных по материалам главы 6

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 **БАК по специальности «патологическая физиология»**; IF **Scopus** – 0,11; **Web of Science**; РИНЦ).

2. 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**).

3. 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**).

4. 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).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Широкая встречаемость сахарного диабета второго типа (СД2), характер распространения которого в XX и XXI веках можно охарактеризовать как «неинфекционную эпидемию», и то давление, которое данное заболевание оказывает на здравоохранение и социальную сферу многих стран, обуславливает актуальность изучения особенностей его патогенеза и поисков новых направлений терапии. СД2 является хроническим нарушением метаболизма, имеющим в основе инсулинорезистентность и гипергликемию, приводящие при прогрессировании СД2 к неуклонному снижению количества и секреторной активности β -клеток островков Лангерганса поджелудочной железы. Необходимость поддержания устойчивого гликемического состояния, позволяющего избежать или отсрочить развитие осложнений СД2, ставит перед исследователями задачу замещения повреждённых или утраченных β -клеток новыми функциональными инсулин-продуцирующими клетками. В качестве вариантов заместительной терапии исследователи рассматривают трансплантацию панкреатических островков или отдельных β -клеток, образование новых инсулин-продуцирующих клеток путём дифференцировки стволовых плюрипотентных клеток или дифференцировки неэндокринных клеток самой железы.

Многочисленные исследования показывают, что β -клетки островков Лангерганса не являются единственными источниками секреции инсулина в организме, и клетки, продуцирующие инсулин, встречаются в паренхиме поджелудочной железы и вне островков. Иммуногистохимическое исследование панкреатической ткани с использованием антител к проинсулину и инсулину выявляет инсулин-позитивные клетки (ИПК) в составе ацинусов и в эпителии протоков железы. Взгляды исследователей на природу внеостровковых ИПК менялись от отношения к ним как к артефактам, появляющимся при подготовке ткани к гистологическому исследованию [48], до представления о них как об истинных клетках поджелудочной железы,

синтез инсулина которыми подтверждается активацией в них транскрипции гена инсулина и проинсулина. Согласно наблюдениям, при экспериментальном аллоксановом диабете инсулиноциты панкреатических островков подвержены большим деструктивным изменениям, чем внеостровковые инсулиноциты [5]. Одной из возможных причин этого может быть сниженное по сравнению с островковыми β -клетками количество GLUT2 рецепторов на мембране внеостровковых ИПК, что обеспечивает последним большую защиту от глюкотоксичности в условиях гипергликемии [65]. Исходя из этого, внеостровковые ИПК поджелудочной железы представляют интерес для терапии СД2, что обуславливает важность их изучения. Однако, внеостровковые ИПК остаются недостаточно изученными, их клеточные предшественники и механизмы образования до конца не ясны, а в литературе отсутствует подробная морфо-функциональная характеристика данного типа клеток в норме и при развитии СД2. Возможно, внеостровковые ИПК являются частью диффузной эндокринной системы, значение и функции которой для продукции инсулина в норме и при патологии до конца не ясны.

Среди факторов, способных активировать образование и синтетическую активность ИПК за пределами островков Лангерганса, разные авторы называют гипергликемию, интенсивность воспаления в поджелудочной железе, активность транскрипционных факторов в панкреоцитах и ряд других. Особую роль в регуляции образования и функционирования внеостровковых ИПК поджелудочной железы исследователи отводят макрофагам, поскольку эти клетки иммунной системы регулируют гомеостаз в ткани железы, в частности, контролируют пролиферацию и апоптоз β -клеток.

Вопросы, касающиеся макрофагальной регуляции регенерации тканей, находятся в фокусе внимания исследователей уже в течение нескольких десятилетий. Способность макрофагов синтезировать биологически активные вещества широкого спектра действия в сочетании с пластичностью, заключающейся в изменении спектра продуцируемых веществ в зависимости от общего состояния организма и локального микроокружения, делает их

ключевыми регуляторами восстановления структуры и функции повреждённых органов. Проведено множество экспериментальных работ, демонстрирующих вовлечённость макрофагов как в процесс повреждения, так и в процесс восстановления органов, и свидетельствующих о значимости информационных стимулов, посылаемых макрофагами и воспринимаемых резидентными клетками окружающей ткани, для регенерации. Особенно большое значение деятельность макрофагов имеет при СД2 в силу выраженной воспалительной компоненты в патогенезе этого заболевания.

Продукция макрофагов зависит от тканевого микроокружения, поэтому изучение их вне организма затруднительно. В качестве инструмента воздействия на макрофаги *in vivo* был выбран аминоталгидразид натрия (АФГ), описанный в литературе как модулятор активности макрофагов, обладающий противовоспалительной и антиоксидантной активностью [176, 195]. Введение АФГ крысам с СД2 осуществлялось курсом из 20 внутримышечных инъекций в течение 30 дней по схеме, разработанной Даниловой И.Г. с соавторами.

Цель и задачи работы были сформулированы, исходя из существующих пробелов в биологии внеостровковых ИПК поджелудочной железы, а именно отсутствия описания морфо-физиологических особенностей данного типа клеток и характера их расположения в паренхиме поджелудочной железы в физиологически нормальных условиях и при экспериментальном моделировании СД2, а также анализа возможных механизмов макрофагальной регуляции образования и функционирования данного типа клеток.

Установлено, что ИПК располагаются в паренхиме поджелудочной железы поодиночке или малыми группами в составе ацинусов и в эпителии протоков как у физиологически интактных крыс, так и у крыс с экспериментальным СД2. У интактных крыс количество внеостровковых ИПК составляет не более 3 % от общего числа инсулин-содержащих клеток железы, а при развитии экспериментального СД2 доля внеостровковых ИПК от всех ИПК увеличивается в 2-3 раза. Внеостровковые ИПК располагаются

преимущественно в составе ацинусов экзокринной части поджелудочной железы, где их количество более чем в 3,5 раза превышает таковое в эпителии протоков железы. Данное наблюдение справедливо как для интактных крыс, так и для крыс с СД2. ИПК в составе ацинусов железы не только более многочисленны, они также имеют большие размеры, чем ИПК в эпителии протоков. У интактных животных показатели функциональной активности ацинарных и протоковых ИПК не отличаются, а при развитии СД2 отмечена тенденция к снижению функциональной активности внеостровковых ИПК обеих субпопуляций.

При повреждении поджелудочной железы, вызванной развитием экспериментального СД2, увеличивалась инфильтрация макрофагами ацинарной части паренхимы железы. Очевидно, это вело к нарастанию интенсивности воспалительного процесса в ацинусах, поскольку известно, что при развитии СД2 ткань поджелудочной железы инфильтрируется макрофагами провоспалительного типа. Модуляция активности макрофагов введением АФГ приводила, во-первых, к уменьшению общего количества макрофагов в железе, а, во-вторых, к перераспределению их в неэндокринной паренхиме, результатом которого являлось уменьшение макрофагальной инфильтрации ацинусов. Задача воздействия на макрофаги заключалась в сдвиге их активации в сторону М2 макрофагов. Если учитывать возможную вовлечённость белка F4/80, использованного в работе для идентификации макрофагов, в образование регуляторных Т-клеток [270], и, следовательно, трактовать его как маркер М1 макрофагов, то на основании данных о количестве макрофагов в ткани поджелудочной железы можно сделать вывод о снижении инфильтрации ацинусов железы провоспалительными макрофагами в результате модуляции их функциональной активности.

Альтернативно активированные М2 макрофаги оказывают протекторное действие на β -клетки, вызывая их пролиферацию и усиливая секрецию инсулина в них [16, 25, 203, 224]. Ввиду существования тесной связи между макрофагами и пролиферацией и жизнедеятельностью β -клеток, логично

предположить, что факторы, секретируемые дифференциально активированными макрофагами, влияющие на функциональную массу β -клеток, будут влиять и на образование и функционирование внеостровковых ИПК.

Для оценки влияния функциональной активности макрофагов на внеостровковые ИПК были выбраны те цитокины, по экспрессии которых можно не только судить о направлении поляризации макрофагов, но и с помощью которых макрофаги могут воздействовать на образование и функционирование инсулиноцитов. TNF- α и IFN γ способствуют активации макрофагов по классическому пути, выступая в качестве эндогенных переключателей, запускающих развитие воспалительных реакций при СД2, а TGF- β 1, напротив, ассоциирован с дифференцировкой макрофагов по M2 пути, способствующему пролиферации клеток и восстановлению функций ткани. TNF- α и IFN γ относятся к числу цитокинов, оказывающих наиболее выраженное негативное воздействие на функционирование β -клеток. TNF- α и IFN γ вносят вклад в развитие стресса эндоплазматического ретикула, который проявляется в виде нарушения фолдинга белков и, с большой вероятностью, ведёт к развитию пироптоза, усиливают окислительную активность iNOS и NADPH, нарушают секрецию инсулина. Согласно данным ряда авторов, TGF- β 1, напротив, способствует пролиферации β -клеток.

Закономерное увеличение концентрации TNF- α и IFN γ в крови и снижение концентрации TGF- β 1 в ткани поджелудочной железы на фоне увеличения инфильтрации ацинусов макрофагами свидетельствовало о развитии воспалительных реакций в ткани железы. Модуляция функциональной активности макрофагов, вызывая снижение количества IFN γ в крови, количества TNF- α в ткани железы и увеличение количества TGF- β 1 в крови и железе, снижала интенсивность воспалительных процессов в поджелудочной железе, что могло способствовать трансдифференцировке неэндокринных панкреоцитов в инсулиноциты.

Анализируя количество и функциональную активность внеостровковых ИПК поджелудочной железы на фоне картины инфильтрации неэндокринной части железы провоспалительными макрофагами и концентрации в ткани железы цитокинов при СД2 и после воздействия на функциональную активность макрофагов, можно сделать вывод о том, что макрофаги влияли на образование и функционирование внеостровковых ИПК. Увеличение количества ИПК в неэндокринной части железы было ассоциировано с ростом концентрации TGF- β 1 и снижением концентрации TNF- α в ткани железы. Таким образом, полученные в работе данные демонстрируют связь между количеством и функциональной активностью макрофагов и образованием и функционированием внеостровковых ИПК. Усиление количества внеостровковых ИПК поджелудочной железы и их функциональной активности наблюдалось на фоне уменьшения интенсивности воспалительных реакций в неэндокринной части паренхимы железы.

Результатом трансдифференцировки собственных неэндокринных клеток поджелудочной железы должны являться клетки, не просто способные производить инсулин, но такие, в которых осуществляется индукция секреции инсулина и быстрое его выделение адекватно физиологическим сигналам. Это возможно в том случае, если во вновь образованных внеостровковых ИПК будут активен тот же комплекс генов, что и в островковых β -клетках. Для выяснения механизмов воздействия макрофагов на внеостровковые ИПК необходимо выяснить, как макрофаги влияют на гены, связанные с синтезом и секрецией инсулина.

Транскрипционный фактор Pdx1 играет решающую роль как в образовании и функционировании β -клеток панкреатических островков в эмбриональный период и их функционировании во взрослом организме, так и в дедифференцировке неэндокринных клеток железы в ИПК. Основное количество Pdx1-позитивных панкреоцитов локализовано в островках Лангерганса, однако клетки, экспрессирующие Pdx1, присутствуют также в

неэндокринной части паренхимы железы как интактных крыс, так и крыс с экспериментальным СД2. Развитие СД2 сопровождалось снижением количества Pdx1-позитивных клеток в неэндокринной части железы, а модуляция активности макрофагов, напротив, увеличением их количества, что согласуется с количеством и функциональной активностью внеостровковых ИПК. Отмеченное на тридцатый день экспериментального диабета увеличение количества и размеров одиночных ИПК, расположенных в составе ацинусов, хорошо соотносится с тем фактом, что снижение количества Pdx1-позитивных клеток в составе ацинусов наблюдалось лишь на шестидесятые сутки развития СД2.

Таким образом, сигналы, вырабатываемые макрофагами, влияют на неэндокринные клетки поджелудочной железы, и, в зависимости от направления поляризации макрофагов, определяющей интенсивность воспалительных реакций в ткани железы, могут способствовать трансдифференцировке ацинарных и протоковых клеток железы в ИПК. В результате снижения макрофагальной инфильтрации ацинусов железы при СД2, в неэндокринных клетках железы усиливается экспрессия транскрипционного фактора Pdx1, что, в сочетании со снижением уровнем воспаления, приводит к трансдифференцировке панкреоцитов в ИПК. Другим механизмом влияния макрофагов на внеостровковые ИПК является усиление продукции TGF- β 1, влияющего на пролиферацию инсулиноцитов и трансдифференцировку в инсулин-продуцирующие клетки, в ткани железы.

При воздействии на функциональную активность макрофагов у крыс с СД2 наблюдалось не только увеличение количества ИПК в составе ацинусов и в эпителии протоков железы, но и снижение выраженности гипергликемии и повышение концентрации инсулина в крови до уровня физиологически интактных животных.

Что касается возможности образования внеостровковых ИПК из стволовых клеток, рекрутируемых в поджелудочную железу при повреждении органа, вызванном развитием СД2, то влияние макрофагов на этот процесс

остаётся недоказанным, хотя его и нельзя полностью отвергать. Литературные данные демонстрируют участие взаимодействия SCF и c-kit – рецептора, связывание с которым приводит к его активации, имеющей решающее значение для дифференцировки стволовых клеток, в дифференцировке и пролиферации эндокринных островковых клеток во время развития поджелудочной железы плода человека [81, 115]. Доказано влияние макрофагов на выход гемопоэтических клеток из костного мозга и их миграция в зону повреждения [14].

Уровень SCF в крови и ткани поджелудочной железы, повышенный у животных с СД2, не снижался и при модуляции функциональной активности макрофагов. Однако, в панкреоцитах неэндокринной части железы не происходило усиления экспрессии рецептора к SCF – белку c-kit. Объяснением этого факта может быть упоминаемая в литературе компенсаторная деградация рецептора c-kit, вызванная повышенным содержанием SCF, и являющаяся, предположительно, одним из механизмов ограничения эффектов SCF во время воспаления [64, 90].

Таким образом, макрофаги, являясь одними из главных координаторов метаболического и тканевого гомеостаза, способны создать в поджелудочной железе микросреду, способствующую образованию ИПК в составе ацинусов и в эпителии протоков.

Выявленные патофизиологические механизмы макрофагальной регуляции образования и функционирования внеостровковых ИПК схематично изображены на *рисунке 8*.

Количество внеостровковых ИПК в поджелудочной железе и их функциональная активность зависят от содержания триады транскрипционных факторов (3TF), в первую очередь Pdx1, в неэндокринных клетках железы. Помимо количества Pdx1, на трансдифференцировку неэндокринных панкреоцитов в ИПК влияет уровень воспаления в ткани железы и содержание глюкозы в крови. Неизвестно пока, какие комбинации данных факторов необходимы и достаточны для прохождения трансдифференцировки

неэндокринных клеток поджелудочной железы. На фоне повышения концентрации провоспалительного цитокина $\text{TNF-}\alpha$ в крови, характеризующего общий уровень воспалительных реакций при СД2, уменьшения содержания противовоспалительного цитокина $\text{TGF-}\beta 1$ в панкреатической ткани и снижения количества внеостровковых панкреоцитов, экспрессирующих Pdx1, при усилении макрофагальной инфильтрации ацинарной части железы, наблюдалось снижение количества и функциональной активности внеостровковых ИПК.

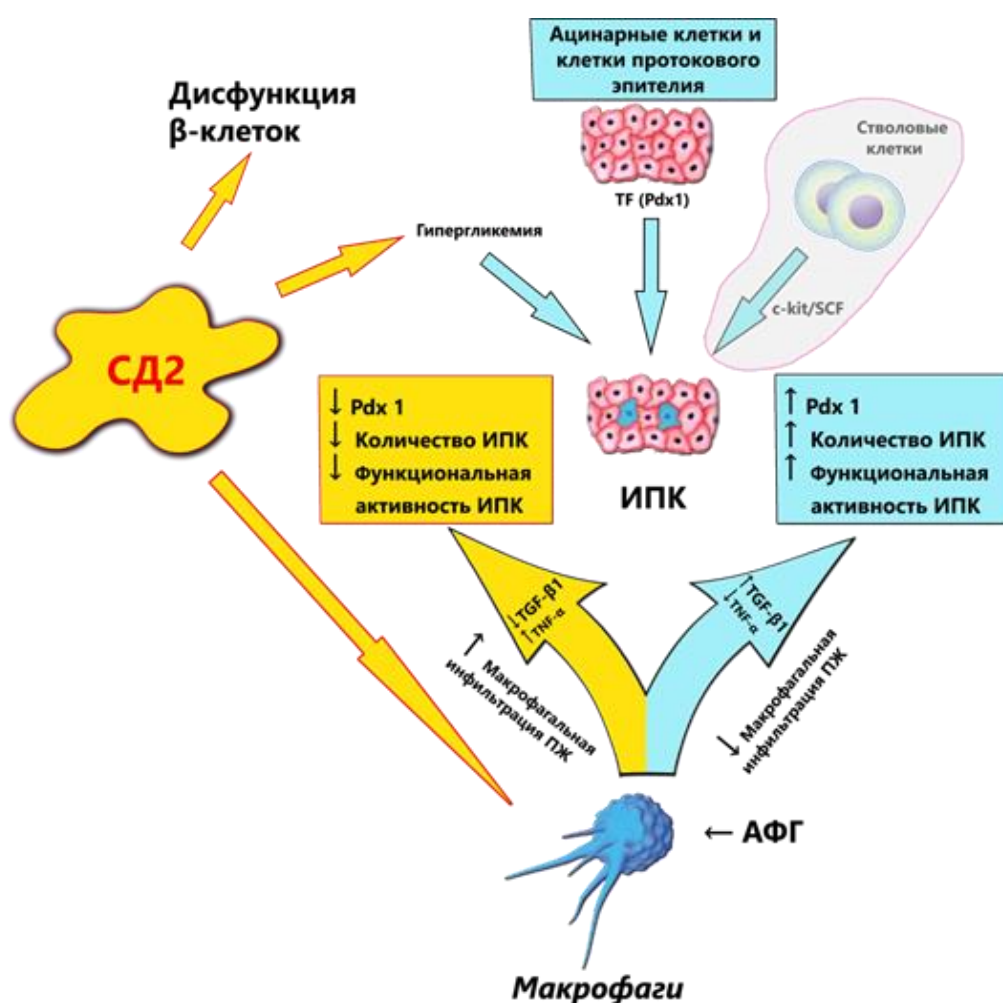


Рисунок 8 – Патофизиологические механизмы макрофагальной регуляции образования и функционирования внеостровковых инсулин-позитивных клеток (ИПК) поджелудочной железы

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

Воздействие на макрофаги аминофталгидразидом 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- β 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 8 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- γ в крови и TNF- α в ткани поджелудочной железы и росту концентрации TGF- β 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, аминоталгидразид натрия может быть использован при разработке новых способов профилактики и терапии СД2.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

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- γ (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- β 1 (transforming growth factor beta 1)	трансформирующий фактор роста бета 1
TNF- α (tumor necrosis factor alpha)	фактор некроза опухоли альфа
β -клетки	бета-клетки островков Лангерганса поджелудочной железы

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абидов, М.Т. Токсический синдром при инфекционном воспалении. Патогенез, обоснование методов коррекции: автореф. дис. на соиск. учен. степ. д-ра мед. наук (14.00.16) / Абидов Муса Тажудинович; Санкт-Петербургская медицинская академия постдипломного образования. – Санкт-Петербург, 1994. – 35 с.
2. Балаболкин, М.И. Диабетология / М.И. Балаболкин. – Москва: Медицина, 2000. – 672 с.
3. Баранов, С.А. Поджелудочная железа как единый функционально взаимосвязанный орган / С.А. Баранов, В.М. Нечаев // Медицинский совет. – 2017. – № 11. – С. 148-151.
4. Белоусова, О.Н. Молекулярные и генетические механизмы патогенеза сахарного диабета 2 типа / О.Н. Белоусова, С.С. Сиротина, Т.И. Якунченко, Н.И. Жернакова // Научные ведомости. Серия Медицина. Фармация. – 2015. – № 16 (213), вып. 31. – С. 12-19.
5. Булавинцева, Т.С. Особенности развития компенсаторных процессов в инсулин-синтезирующей системе при аллоксановом диабете / Т.С. Булавинцева, Б.Г. Юшков, К.В. Соколова, И.Г. Данилова // Российский физиологического журнала им И.М. Сеченова. – 2018. – № 11 (104). – С. 1291-1300. DOI: 10.1134/S0869813918110031.
6. Винокурова, Л.В. Особенности клинического течения и терапии хронического панкреатита в зависимости от стадии заболевания / Л.В. Винокурова, И.Е. Трубицына // Лечащий врач. – 2010. – № 2. – С. 48.
7. Данилова, И.Г. Влияние системы фагоцитирующих мононуклеаров на регенерацию тканей с разной восстановительной способностью (экспериментальное исследование): автореф. дис. ... на соиск. учен. степ. д-ра биол. наук (03.00.13) / Данилова Ирина Георгиевна. – Екатеринбург, 2006. – 50 с.
8. Дедов, И.И. Введение в диабетологию: руководство для врачей / И.И. Дедов, В.В. Фадеев. – Москва: Изд-во «Берег», 1998. – 200 с.

9. Зайчик, А.Ш. Основы патохимии: учебник для студентов мед. ВУЗов / А.Ш. Зайчик, Л.П. Чурилов. – Санкт-Петербург: ЭЛБИ, 2001. – 688 с.
10. Захаров, Ю.М. Эритробластический островок / Ю.М. Захаров, А.Г. Рассохин. – Москва: Медицина, 2002. – 280 с.
11. Ильин, А.В. Гликированный гемоглобин как ключевой параметр при мониторинге больных сахарным диабетом. Оптимальная организация исследований / А.В. Ильин, М.И. Арбузова, А.П. Князева // Сахарный диабет. – 2008. – № 2. – С. 60-64.
12. Иммуногистохимические методы: руководство / Ed. By G.L. Kumar, L. Rudbeck; пер. с англ.; под ред. Г.А. Франка и П.Г. Малькова. – Москва: Dako, 2011. – 224 с.
13. 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 др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2020. – № 19(4). – С. 6-13.
14. 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.
15. Кетлинский, С.А. Цитокины мононуклеарных фагоцитов в регуляции воспаления и иммунитета / С.А. Кетлинский, Н.М. Калинина // Иммунология. – 1995. – № 3. – С. 30-44.
16. 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.
17. Михайличенко, В.Ю. Роль инсулярных и контринсулярных гормонов в патогенезе аллоксанового сахарного диабета у крыс в эксперименте / В.Ю. Михайличенко, С.С. Столяров // Современные проблемы науки и образования.

– 2015. – № 4. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=21235> (дата обращения: 15.01.2020).

18. Можейко, Л.А. Экспериментальные модели для изучения сахарного диабета: ч. I: Аллоксановый диабет / Л.А. Можейко // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2013. – № 3. – С. 26-29.

19. Можейко, Л.А. Экспериментальные модели для изучения сахарного диабета: ч. II: Хирургический, стрептозотоциновый и дитизоновый диабет / Л.А. Можейко // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2013. – № 4. – С. 5-10.

20. Нагоев, Б.С. Хронические вирусные гепатиты: иммунопатологические, клинко-диагностические и терапевтические аспекты / Б.С. Нагоев, М.Т. Абидов, З.Б. Понезева. – Майкоп: ГУРИПП «Адыгея», 2005.

21. Нагорная, Н.В. Внешнесекреторная функция поджелудочной железы и методы её оценки / Н.В. Нагорная, М.П. Лимаренко // Здоровье ребенка. – 2012. – № 8 (43). – С. 118-122.

22. Направленная иммунокоррекция: проблемы, перспективы / под ред. докт. мед. наук проф. М.Т. Абидова. – Москва: Изд-во РАМН, 2000. – 104 с. (прил. 3 к журн. «Бюллетень экспериментальной биологии и медицины» за 2000 г.).

23. Неиммунологические функции макрофагов / Б.Г. Юшков, М.Т. Абидов, И.Г. Данилова, С.Ю. Медведева. – Екатеринбург: УрО РАН, 2011. – 246 с.

24. 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.

25. Особенности биологии трансформирующего ростового фактора β и иммунопатология / А.В. Москалёв, А.С. Рудой, А.В. Апчел, [и др.] // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2016. – №2 (54). – С. 206-216.

26. Пелипенко, Л.В. Эффекты трансформирующего фактора роста бета-1/ Л.В. Пелипенко, А.В. Сергиенко, М.Н. Ивашев // Международный журнал экспериментального образования. – 2015. – № 3 (4). – С. 558-559.

27. Писарев, В.Б. Механизмы токсического действия аллоксана на β -клетки островков Лангерганса / В.Б. Писарев, Г.Л. Снигур, А.А. Спасов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2009. – № 12. – С. 700-702.

28. Плехова, Н.Г. Роль моноцитов/макрофагов в патогенезе вирусных инфекций / Н.Г. Плехова, Л.М. Сомова // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2010. – № 3(41). – С. 5-9.

29. Плюшкина, А.С. C-kit - маркер стволовых клеток эндокриноцитов поджелудочной железы человека / А.С. Плюшкина, М.С. Калигин, Д.И. Андреева // Морфология. – 2011. – Т. 140, № 4. – С.32-37.

30. 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.

31. При экспериментальном диабете у крыс транскрипционный фактор MAFA синтезируется в дифференцированных клетках островков поджелудочной железы и не является маркером клеток-предшественниц / М.С. Калигин, А.А. Титова, Д.И. Андреева // Гены @ Клетки. – 2019. – № 3. – С. 137-141.

32. Реакция островковых и внеостровковых эндокриноцитов при моделировании сахарного диабета 1 и 2 типа / А.В. Белоусова, К.В. Соколова, И.Ф. Гетте, [и др.] // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2018. – Т. 15, № 3. – С. 405-412. DOI: 10.22138/2500-0918-2018-15-3-405-412.

33. Самотруева, М.А. Сахарный диабет: особенности экспериментального моделирования / М.А. Самотруева, М.У. Сергалиева // Астраханский медицинский журнал. – 2019. – Т. 14, № 3. – С. 45-57.

34. Сарбаева, Н.Н. Макрофаги: разнообразие фенотипов и функций, взаимодействие с чужеродными материалами / Н.Н. Сарбаева, Ю.В. Пономарева, М.Н. Милякова // Гены & клетки. – 2016. – Т. XI, № 1. – С. 9-17.

35. Симбирцев, А.С. Интерлейкин-2 и рецепторный комплекс интерлейкина-2 в регуляции иммунитета // Иммунология. – 1998. – № 4. – С. 3-9.

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

37. Синусоидальные клетки и цитокиновый ответ при тетрахлорметан-индуцированной гепатотоксичности и способ её коррекции / З.А. Шафигуллина, И.Г. Данилова, С.Ю. Медведева, [и др.] // Медицинская иммунология. – 2019. – № 21 (5). – С. 929-936. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2019-5-929-936>

38. Системное воспаление в патогенезе метаболического синдрома и ассоциированных с ним заболеваний / И.Д. Беспалова, Н.В. Рязанцев, В.В. Калюжин, [и др.] // Сибирский медицинский журнал. – 2013. – № 2. – С. 5-9.

39. Спасов, А.А. Экспериментальная модель сахарного диабета типа 2 / А.А. Спасов, М.П. Воронкова, Г.Л. Снигур // Биомедицина. – 2011. – № 3. – С. 12-18.

40. Статистика малых выборок в медицинских исследованиях / А.М. Носовский, А.Э. Пихлак, В.А. Логачев, [и др.] // Российский медицинский журнал. – 2013. – № 6. – С. 57-60.

41. Федюнина, И.А. Получение инсулин-продуцирующих клеток из различных популяций мультипотентных стромальных клеток жировой ткани и пупочного канатика человека / И.А. Федюнина, А.А. Ржанинова, Е.Е. Кириенко, Д.В. Гольдштейн // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2011. – № 1. – С. 10-16.

42. Храмцова, Ю.С. Роль иммунной системы в регуляции регенерации тканей с разной восстановительной способностью: автореф. дис. на соиск. учен. степ. канд. биол. наук (03.00.13) / Юлия Сергеевна Храмцова. – Екатеринбург, 2004. – 24 с.

43. Чернух, А.М. Воспаление: очерки патологии и экспериментальной терапии / А.М. Чернух. – Москва: Медицина, 1979. – 448 с.

44. Шварц, В.Я. Воспаление жировой ткани: ч. 2: Патогенетическая роль при сахарном диабете 2-го типа / В.Я. Шварц // Проблемы эндокринологии. – 2009. – Т. 55, № 5. – С. 43-48.

45. Эллиниди, В.Н. Практическая иммуногистохимия: метод. рек. / В.Н. Эллиниди, Н.В. Аникиева, Н.А. Максимова. – Санкт-Петербург, 2002. – 36 с.
46. Юшков, Б.Г. Клетки иммунной системы и регуляция регенерации / Б.Г. Юшков // Бюллетень сибирской медицины. – 2017. – 16 (4). – С. 94-105.
47. Юшков, Б.Г. Повреждение и регенерация / Б.Г. Юшков, В.Г. Климин. – Москва: Комментарий, 2017. – 132 с.
48. Яглов, В.В. Актуальные проблемы биологии ацинаостровковых клеток поджелудочной железы / В.В. Яглов, Н.В. Яглова // Вестник Российской АМН. – 2010. – № 7. – С. 28-35.
49. Abidov, M.T. New N-heterocyclic pharmaceuticals for humans / M.T. Abidov // Almanach (Pol.). – 2016. – Vol. 11. – P. 74-80.
50. Accelerated liver recovery after acute CCl₄ poisoning in rats treated with sodium phthalhydrazide / I.G. Danilova, Z.A. Shafigullina, I.F. Gette, [et al.] // International Immunopharmacology. – 2020. – Vol. 80, article number 106124. – 11 pp. 10.1016/j.intimp.2019.106124.
51. Acquisition of Dynamic Function in Human Stem Cell-Derived β Cells / L. Velazco-Cruz, J. Song, K.G. Maxwell, [et al.] // Stem Cell Reports. – 2019. – Vol. 12. – P. 351-365.
52. 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. – 147(5). – P. 1106-1118.e11.
53. Activin A, exendin-4, and glucose stimulate differentiation of human pancreatic ductal cells / H.-S. Kim, S.-H. Hong, S.-H. Oh, [et al.] // J. Endocrinol. – 2013. Vol. 217, iss. 3. – P. 241-252. doi:10.1530/JOE-12-0474.
54. Activin receptor patterning of foregut organogenesis / S.K. Kim, M. Hebrok, E. Li, [et al.] // Genes Dev. – 2000. – Aug 1, vol. 14 (15). – P. 1866-71.
55. Akash, M.S.H. Tumor Necrosis Factor - Alpha: Role in Development of Insulin Resistance and Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus / M.S.H. Akash, K.

Rehman, A. Liaquat // *Journal of Cellular Biochemistry*. – 2017. – Jan., vol. 119 (1). – P. 105-110. <https://doi.org/10.1002/jcb.26174>.

56. Aldossari, N.M. Association between salivary amylase enzyme activity and obesity in Saudi Arabia / N.M. Aldossari, E.E. El Gabry, G. Gawish // *Medicine*. – 2019. – Jun 7., vol. 98 (23). – P. e15878. <https://doi.org/10.1097/MD00000000000015878>.

57. Al-Mutairi, N. Effects of Tumor Necrosis Factor α Inhibitors Extend Beyond Psoriasis: Insulin Sensitivity in Psoriasis Patients With Type 2 Diabetes Mellitus / N. Al-Mutairi, D. Shabaan // *Cutis*. – 2016. – March., vol. 97 (3). – P. 235-241.

58. Alternatively activated macrophages promote pancreatic fibrosis in chronic pancreatitis / J. Xue, V. Sharma, M.H. Hsieh, [et al.] // *Nature communications*. – 2015. – Vol. 6. – P. 7158. <https://doi.org/10.1038/ncomms8158>.

59. Alzamil, H. Elevated Serum TNF- α Is Related to Obesity in Type 2 Diabetes Mellitus and Is Associated with Glycemic Control and Insulin Resistance / H. Alzamil // *Journal of Obesity*. – 2020. – Vol. 2020. Article ID 5076858. – P. 1-5.

60. Analysis of inflammatory cytokine and TLR expression levels in Type 2 Diabetes with complications / S. Gupta, A. Maratha, J. Siednienko, [et al.] // *Nature*. – 2017. – N 7. – P. 7623.

61. Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes / A. Willcox, S.J. Richardson, A.J. Bone, [et al.] // *Clin Exp Immunology*. – 2009. – Feb., N 155 (2). – P. 173-81.

62. Anderson, M.S. The NOD mouse: a model of immune dysregulation / M.S. Anderson, J.A. Bluestone // *Annu Rev Immunol*. – 2005. – Vol. 23. – P. 447-485.

63. Arias-Díaz, J. Animal models in glucose intolerance and type-2 diabetes / J. Arias-Díaz, J. Balibrea // *NutrHosp*. – 2007. – Mar-Apr., vol. 22 (2). – P. 160-8.

64. Ashman, L.K. The biology of stem cell factor and its receptor C-kit / L.K. Ashman // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. – 1999. – Vol. 31, iss. 10. – P. 1037-1051. ISSN 1357-2725, [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(99\)00076-X](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(99)00076-X).

65. 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, D.J. Hill // *Islets*. – 2016. – Vol. 8 (3). – P. 65-82. doi: 10.1080/19382014.2016.1162367.

66. Belcher, E.H. Studies of red cell life span in the rat / E.H. Belcher, E.B. Harriss // *The Journal of physiology*. – 1959. – May 19, vol. 146 (2). – P. 217-234. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1959.sp006190>.

67. Bensley, R.R. Studies on the pancreas of the guinea pig / R.R. Bensley // *Am J Anat*. – 1911. – Vol. 12. – P. 297-388.

68. Bernardo, M.E. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation / M.E. Bernardo, W.E. Fibbe // *Cell Stem Cell*. – 2013. – Vol. 13 (4). – P. 392-402.

69. Bertelli, E. Association between Endocrine Pancreas and Ductal System. More than an Epiphenomenon of Endocrine Differentiation and Development? / E. Bertelli, M. Benda // *Journal of Histochemistry&Cytochemistry*. – 2005. – Vol. 53 (9). – P. 1071-1086.

70. 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, M. Bendayan // *Diabetologia*. – 2001. – Vol. 44. – P.575-584.

71. Bioluminescence imaging of myeloperoxidase activity in vivo / S. Gross, S.T. Gammon, B.L. Moss, [et al.] // *Nat Med*. – 2009. – Apr., vol. 15 (4): 455-61. doi: 10.1038/nm.1886.

72. Blobe, G.C. Role of transforming growth factor beta in human disease / G.C. Blobe, W.P. Schiemann, H.F. Lodish, [et al.] // *N. Engl. J. Med*. – 2000. – Vol. 342. – P. 1350-1358.

73. Blood and islet phenotypes indicate immunological heterogeneity in type 1 diabetes / S. Arif, P. Leete, V. Nguyen [et al.] // *Diabetes*. – 2014. – Nov., vol. 63 (11). – P. 3835-45.

74. Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration / D. Hess, L. Li, M. Martin, [et al.] // *Nat Biotechnol*. – 2003. – Vol. 21. – P. 763-770. <https://doi.org/10.1038/nbt841>.

75. Böni-Schnetzler, M. Islet inflammation in type 2 diabetes / M. Böni-Schnetzler, D.T. Meier // *Semin Immunopathol.* – 2019. – Vol. 41 (4). – P. 501-513. doi:10.1007/s00281-019-00745-4.
76. Bornfeldt, K.E. Insulin resistance, hyperglycemia and atherosclerosis / K.E. Bornfeldt, I. Tabas // *Cell Metab.* – 2011. – Vol. 14. – P. 575-585.
77. Boroujeni, N.B. The reversal of hyperglycemia after transplantation of mouse embryonic stem cells induced into early hepatocyte-like cells in streptozotocin-induced diabetic mice / N.B. Boroujeni, S.M. Hashemi, Z. Khaki, M. Soleimani // *Tissue and Cell.* – 2011. – Apr., vol. 43, iss. 2. – P. 75-82. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2010.12.002>.
78. Bouwens, L. Extra-insular beta cells associated with ductules are frequent in adult human pancreas / L. Bouwens, D.G. Pipeleers // *Diabetologia.* – 1998. – Jun; 41(6). – P. 629-633.
79. Butler, P.C. The replication of beta cells in normal physiology, in disease and for therapy / P.C. Butler, J.J. Meier, A.E. Butler, A. Bhushan // *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* – 2007. – Vol. 3. – P. 758-768.
80. Cao, X. Transplantation of mesenchymal stem cells recruits trophic macrophages to induce pancreatic beta cell regeneration in diabetic mice / X. Cao, Z.B. Han, H. Zhao, Q. Liu // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* – 2014. – Aug.; 53. – P. 372-9. doi: 10.1016/j.biocel.2014.06.003. Epub 2014 Jun 7. PMID: 24915493.
81. Cardoso, H.J. The stem cell factor (SCF)/c-KIT signalling in testis and prostate cancer / H.J. Cardoso, M.I. Figueira, S. Socorro // *Journal of cell communication and signaling.* – 2017. – Vol. 11 (4). – P. 297-307. <https://doi.org/10.1007/s12079-017-0399-1>.
82. Cassado, A. F4/80 as a Major Macrophage Marker: The Case of the Peritoneum and Spleen / A. Cassado // *Results Probl Cell Differ.* – 2017. – Vol. 62. – P. 161-179. doi: 10.1007/978-3-319-54090-0_7.
83. Chang, C.-C. Interferon gamma-induced protein 10 is associated with insulin resistance and incident diabetes in patients with nonalcoholic fatty liver disease / C.-C. Chang, C.-L. Wu, W.-W. Su, [et al.] // *Sci. Rep.* – 2015. – May; 5. – № 10096. <https://doi.org/10.1038/srep10096>.

84. Chang-Chen, K.J. Beta-cell failure as a complication of diabetes / K.J. Chang-Chen, R. Mullur, E. Bernal-Mizrachi // *Rev Endocr Metab Disord.* – 2008. – Vol. 9. – P. 329-343.
85. Characterization of endocrine progenitor cells and critical factors for their differentiation in human adult pancreatic cell culture / R. Gao, J. Ustinov, M.-A. Pulkkinen, [et al.] // *Diabetes.* – 2003. – Vol. 52 (8). – P. 2007-15.
86. Chatterjee, S. Macrophages in Diabetes Mellitus: A Review on Understanding of Macrophage Function / S. Chatterjee, S. Guria // *World Scientific News.* – 2019. – Vol. 134(2). – 319-325.
87. Chazaud, B. Macrophages: supportive cells for tissue repair and regeneration / B. Chazaud // *Immunobiology.* – 2014. – Vol. 219, №. 3. – P. 172-178.
88. Chentoufi, A.A. Insulin expression levels in the thymus modulate insulin-specific autoreactive T-cell tolerance: the mechanism by which the IDDM2 locus may predispose to diabetes / A.A. Chentoufi, C. Polychronakos // *Diabetes.* – 2002. – May; 51(5). – P. 1383-90. doi: 10.2337/diabetes.51.5.1383. Erratum in: *Diabetes* 2002 Aug;51(8):2665. PMID: 11978634.
89. Cieślak, M. Role of pro-inflammatory cytokines of pancreatic islets and prospects of elaboration of new methods for the diabetes treatment / M. Cieślak, A. Wotczak, M. Cieślak // *ActaBiochim Pol.* – 2015. – Vol. 62 (1). – P. 15-21.
90. c-Kit and stem cell factor regulate PANC-1 cell differentiation into insulin- and glucagon-producing cells / Y. Wu, J. Li, S. Saleem [et al.] // *Lab Invest.* – 2010. – 07 June; 90. – P. 1373-1384. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2010.106>.
91. Co-localization of acinar markers and insulin in pancreatic cells of subjects with type 2 diabetes / M. Masini, L. Marselli, E. Himpe, [et al.] // *PloS ONE.* – 2017. – Jun 15; 12 (6). – P. e0179398. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179398>.
92. 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 translational medicine.* – 2015. – Vol. 4 (6). – P. 555-563. <https://doi.org/10.5966/sctm.2014-0272>.

93. Conlon, J.M. Characterization of immunoreactive components of insulin and somatostatin in canine pancreatic juice / J.M. Conlon, D. Rouiller, G. Boden, R.H. Unger // *FEBS Lett.* – 1979. – Sept 01; vol. 105, iss. 1. – P. 23-26.
94. Controls for immunohistochemistry: the Histochemical Society's standards of practice for validation of immunohistochemical assays / S.M. Hewitt, D.G. Baskin, C.W. Frevert, [et al.] // *J Histochem Cytochem.* – 2014. – Vol. 62 (10). – P. 693-697. doi:10.1369/0022155414545224.
95. Correlations of In Vivo β - Cell Function Tests With β - Cell Mass and Pancreatic Insulin Content in Streptozocin - Administered Baboons / D.K. McCulloch, D.J. Koerker, S.E. Kahn [et al.] // *Diabetes.* – 1991. – Vol. 40 (6). – P. 673-679.
96. Cruz, A.F. Macrophages in the pancreas: Villains by circumstances, not necessarily by actions / A.F. Cruz, R. Rohban, F. Esni // *Immun Inflamm Dis.* – 2020. – Vol. 8. – P. 807-824. <https://doi.org/10.1002/iid3.345>.
97. Dalmazi, G.D. Glucocorticoids and Type 2 Diabetes: From Physiology to Pathology / G.D. Dalmazi, U. Pagotto, R. Pasquali, V. Vicennati // *Journal of Nutrition and Metabolism.* – Vol. 2012. – Article ID 525093, 9 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/525093>.
98. Dassaye, R. Transcription factor regulation of pancreatic organogenesis, differentiation and maturation / R. Dassaye, S. Naidoo, M.E. Cerf // *Islets.* – 2016. – Vol. 8 (1). – P. 13-34. doi:10.1080/19382014.2015.1075687.
99. Defective mutations in the insulin promoter factor-1 (ipf-1) gene in late-onset type 2 diabetes mellitus / E.H. Hani, D.A. Stoffers, J.C. Chevre, [et al.] // *J Clin Invest.* – 1999. – Vol. 104. – P. 41-48.
100. Demonstration of two different processes of beta-cell regeneration in a new diabetic mouse model induced by selective perfusion of alloxan / M. Waguri, K. Yamamoto, J.I. Miyagawa, [et al.] – *Diabetes.* – 1997. – Vol. 46. – P. 1281-1290.
101. Denroche, H.C. When beta cells talk back / H.C. Denroche, D. Nackiewicz, C.B. Verchere // *Diabetologia.* – 2018. – Vol. 61. – P. 39-42. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4443-8>.

102. Diabetes: Overview: [электр. ресурс] / World Health Organization, 2020. – Режим доступа: https://www.who.int/health-topics/diabetes#tab=tab_1.
103. Differential expression and localisation of TGF- β isoforms and receptors in the murine epididymis / A. Voisin, C. Damon-Soubeyrand, S. Bravard, [et al.] // *Sci Rep.* – 2020. – Jan. 22, vol. 10. – Article number 995. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57839-5>.
104. Distribution of insulin mRNA transcripts within the human body / G.D. Bell, S. Reddy, X. Sun, [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2014. – Vol. 451. – P. 425-430.
105. Dolan, M.E. Inhibition of DNA repair as a means of increasing the antitumor activity of DNA active agents / M.E. Dolan // *Adv Drug Del Rev.* – 1997. – Vol. 26. – P. 105-118.
106. Domínguez-Bendala, J. Pancreatic Progenitors: There and Back Again / J. Domínguez-Bendala, M.M.F. Qadir, R.L. Pastori // *Trends in Endocrinology & Metabolism.* – 2019. – Vol. 30, № 1. – P. 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.10.002>.
107. Donath, M.Y. Inflammation in obesity and diabetes: islet dysfunction and therapeutic opportunity / M.Y. Donath, E. Dalmas, N.S. Sauter, M. Boni-Schnetzler // *Cell Metab.* – 2013. – Vol. 17. – P. 860-872.
108. Dor, Y. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation / Y. Dor, J. Brown, O.I. Martinez, D.A. Melton // *Nature.* – 2004. – Vol. 429 (6987). – P. 41-6.
109. Dort, J. Macrophages Are Key Regulators of Stem Cells during Skeletal Muscle Regeneration and Diseases / J. Dort, P. Fabre, T. Molina, N.A. Dumont // *Stem Cell International.* – Vol. 2019. – Article ID 4761427. – 20 pp. <https://doi.org/10.1155/2019/4761427>.
110. Dudek, R.W. Induction of islet cytodifferentiation by fetal mesencryme in adult pancreatic ductal epithelium / R.W. Dudek, I.E. Lawrence Jr., R.S. Hill, R.C. Johnson // *Diabetes.* – 1991. – Vol. 40, № 8. – P. 1041-1048.

111. Duque, G.A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases / G.A. Duque, A. Descoteaux // *Frontiers in Immunology*. – 2014. – Vol. 5. – P. 491. doi: 10.3389/fimmu.2014.00491.
112. Ehses, J.A. IL-1 Antagonism Reduces Hyperglycemia and Tissue Inflammation in the Type 2 Diabetic GK rat / J.A. Ehses, G. Lacraz, F. Schmidlin // *Diabetologia*. – 2009. – Vol. 106 (33). – P. 13998-4003.
113. Ehses, J.A. Macrophages, cytokines and beta-cell death in Type 2 diabetes / J.A. Ehses, M. Böni-Schnetzler, M. Faulenbach, M.Y. Donath // *Biochemical Society Transaction*. – 2008. – Vol. 36 (Pt 3). – P. 340-2. doi: 10.1042/BST0360340.
114. Eisenbarth, G.S. Type 1 diabetes mellitus: a chronic autoimmune disease / G.S. Eisenbarth // *N Engl J Med*. – 1986. – Vol. 314. – P. 1360-1368.
115. Ekmekcioglu, S. Hematopoietic Growth Factors and Cytokines, in *The Molecular Basis of Cancer (Fourth Edition)* / S. Ekmekcioglu, R. Kurzrock, E.A. Grimm. – Elsevier Inc. – 2015. – P. 789-808.e4.
116. Eleazu, C.O. Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans / C.O. Eleazu, K.C. Eleazu, S. Chukwuma, U.N. Essien // *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*. – 2013. – Vol. 12 (1). – P. 60.
117. Elimam, H. Inflammatory markers and control of type 2 diabetes mellitus / H. Elimam, A.M. Abdulla, I.M. Taha // *Diabetes MetabSyndr*. – 2019. – Vol. 13(1). – P. 800-804.
118. Eming, S. A. Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration / S.A. Eming, T.A. Wynn, P. Martin // *Science*. – 2017. – Vol. 356 (6342). P. 1026-30.
119. Expansion and conversion of human pancreatic ductal cells into insulin-secreting endocrine cells / J. Lee, T. Sugiyama, Y. Liu [et al.] // *eLife*. – 2013. – Vol. 2. – P. e00940. doi:10.7554/eLife.00940.
120. Expansion of Adult Human Pancreatic Tissue Yields Organoids Harboring Progenitor Cells with Endocrine Differentiation Potential / C.J.M. Loomans, N.W. Giuliani, J. Balak [et al.] // *Stem Cell Reports*. – 2018. – Vol. 10 (3). – P. 712-724.

121. Expansion of Islet-Resident Macrophages Leads to Inflammation Affecting β -Cell proliferation and Function in Obesity / W. Ying, Y.S. Lee, Y. Dong // *Cell Metabolism*. – 2019. – Vol. 29 (2). – P. 457-474. e5. doi: 10.1016/j.cmet.2018.12.003.
122. Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide / P. Masiello, C. Broca, R. Gross, [et al.] // *Diabetes*. – 1998. – Vol. 47 (2). – P. 224-9. doi: 10.2337/diab.47.2.224. PMID: 9519717.
123. Expression of insulin receptors and of 60-kDa receptor substrate in rat mature and immature enterocytes / J.P. Buts, N. De Keyser, S. Marandi [et al.] // *Am J Physiol*. – 1997. – Vol. 273, iss. 1. – P. G217-G226.
124. Expression of Pdx1 mediates differentiation from mesenchymal stem cells into insulin-producing cells / H. Yuan, J. Li, N. Xin [et al.] // *Mol Biol Rep*. – 2010. – Vol. 37 (8). – P. 4023-31. doi: 10.1007/s11033-010-0061-y. Epub 2010 Mar 21.
125. Extra-pancreatic insulin-producing cells in multiple organs in diabetes / H. Kojima, M. Fujimiya, K. Matsumura [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2004. – Vol. 101 (8). – P. 2458-2463.
126. Evaluating the glucose tolerance test in mice / S. Andrikopoulos, A.R. Blair, N. Deluca [et al.] // *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*. – 2008. – Vol. 295, № 6. – P. E1323-32. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90617.2008>.
127. Eyth, E. Glucose Tolerance Test [Updated 2020 Aug 11]. / E. Eyth, H. Basit, C.J. Smith. // *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020. Jan. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532915>.
128. Feng, Z.-C. A survival Kit for pancreatic beta cells: stem cell factor and c-Kit receptor tyrosine kinase / Z.-C. Feng, M. Riopel, A. Popell, R. Wang // *Diabetologia*. – 2015, Apr. – Vol. 58 (4). – P. 654-65.
129. Ferris, H.A. New mechanisms of glucocorticoid-induced insulin resistance: make no bones about it / H.A. Ferris, C.R. Kahn // *Journal of clinical investigation*. – 2012. – Vol. 122, 11. – P. 3854-7. doi:10.1172/JCI66180.
130. Fgf10 is essential for maintaining the proliferative capacity of epithelial progenitor cells during early pancreatic organogenesis / A. Bhushan, N. Itoh, S. Kato, [et al.] // *Development*. – 2001. – Vol. 128. – P. 5109-5117.

131. Formation of insulin-positive cells in implants of human pancreatic duct cell preparations from young donors / M. Bogdani, V. Lefebvre, N. Buelens, [et al.] // *Diabetologia*. – 2003, Jun. – Vol. 46(6). – P. 830-838. <https://doi.org/10.1007/s00125-003-1118-4>.
132. Frier, B.M. Serum trypsin concentration and pancreatic trypsin secretin in insulindependent diabetes mellitus / B.M. Frier, T.E. Adrian, J.H.B. Saunders, S.R. Bloom // *ClinChimActa*. – 1980. – № 105. – P. 297-300.
133. Fujimoto, K. Pdx1 and other factors that regulate pancreatic beta-cell survival / K. Fujimoto, K.S. Polonsky // *Diabetes Obes Metab*. – 2009. – № 11, suppl 4. – P. 30-37. [doi:10.1111/j.1463-1326.2009.01121.x](https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2009.01121.x)
134. Ghasemi, A. Streptozotocin-nicotinamide-induced rat model of type 2 diabetes / A. Ghasemi, S. Khalifi, S. Jeddy // *Acta physiologica Hungarica*. – 2014. – Vol. 101(4). – P. 408-20. [10.1556/APhysiol.101.2014.4.2](https://doi.org/10.1556/APhysiol.101.2014.4.2).
135. Goldfarb, S. TGF-beta: a crucial component of the pathogenesis of diabetic nephropathy / S. Goldfarb, F.N. Ziyadeh // *Transaction of the American Clinical and Climatological Association*. – 2001. – Vol. 112. – P. 27-32; discussion 33.
136. Goldner, M.G. Alloxan diabetes in the dog / M.G. Goldner, G. Gomori // *Endocrinology*. – 1943. – Vol. 33. – P. 297-308.
137. Gomes, K.B. The Role of Transforming Growth Factor-Beta in Diabetic Nephropathy / K.B. Gomes // *International Journal of Medical Genetics*. – Vol. 2014. – Article ID 180270. – 6 p. <https://doi.org/10.1155/2014/180270>.
138. Gordon, S. Tissue macrophages: Heterogeneity and functions / S. Gordon, A. Pluddemann // *BMC Biology*. – 2017, Jun 29. – Vol. 15(1). – P. 53. DOI: [10.1186/s12915-017-0392-4](https://doi.org/10.1186/s12915-017-0392-4).
139. Gu, D. Endocrine/exocrine intermediate cells in streptozotocin-treated Ins-IFN-gamma transgenic mice / D. Gu, M. Arnush, N. Sarvetnick // *Pancreas*. – 1997, Oct. – Vol. 15(3). – P. 246-250. DOI: [10.1097/00006676-199710000-00005](https://doi.org/10.1097/00006676-199710000-00005).
140. Gu, D. Transgenic mice expressing IFN-gamma in pancreatic beta-cells are resistant to streptozotocin-induced diabetes / D. Gu, M. Arnush, S.P. Sawyer, N. Sarvetnick

// Am J Physiol. – 1995, Dec. – Vol. 269 (6 Pt 1). – P. E1089-94. doi: 10.1152/ajpendo.1995.269.6.E1089. PMID: 8572201.

141. Gurtner, G.C. Wound repair and regeneration / G.C. Gurtner, S. Werner, Y. Barrandon, M. Longaker // Nature. – 2008, May 15. – Vol. 453(7193). – P. 314-321. <https://doi.org/10.1038/nature07039>.

142. Gysemans, C. Cytokine signalling in the beta-cell: a dual role for IFN γ / C. Gysemans, H. Callewaert, L. Overbergh, C. Mathieu // Biochem Soc Trans. – 2008, Jun. – Vol. 36 (Pt 3). – P. 328-33. doi: 10.1042/BST0360328. PMID: 18481951.

143. Henderson, J.R. The pancreas as a single organ: the influence of the endocrine upon the exocrine part of the gland / J.R. Henderson, P.M. Daniel, P.A. Fraser // Gut. – 1981. – Vol. 22 (2). P. 158-16.

144. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man / D.R. Matthews, J.P. Hosker, A.S. Rudenski, [et al.] // Diabetologia. – 1985. – Vol. 28. – P. 412-419.

145. Houbracken I., Bouwens L. The quest for tissue stem cells in the pancreas and other organs, and their application in beta-cell replacement / I. Houbracken, L. Bouwens // Rev. Diabet. Stud. – 2010. – Vol. 7. – P. 112-123. doi: 10.1900/RDS.2010.7.112.

146. Hrytsenko, O. Insulin expression in the brain and pituitary cells of tilapia (*Oreochromis niloticus*) / O. Hrytsenko, J.R. Wright Jr., C.M. Morrison, B. Pohajdak // Brain Res. – 2007, Jan 02. – Vol. 1135(1). – P. 31-40.

147. Hui, H. Pancreas duodenum homeobox-1 regulates pancreas development during embryogenesis and islet cell function in adulthood / H. Hui, R. Perfetti // European Journal of Endocrinology. – 2002. – Vol. 146 (2). – P. 129-141. doi: 10.1530/eje.0.1460129.

148. 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 (1). – P. 59-68. doi:10.4239/wjd.v5.i1.59.

149. Identification of Markers that Distinguish Monocyte-Derived Fibrocytes from Monocytes, Macrophages and Fibroblasts / D. Pilling, T. Fan, D. Huang // PLOS

ONE. – 2009, oct 16. – Vol. 4, iss. 10. – e7475.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007475>.

150. Immunoregulatory potential of mesenchymal stem cells following activation by macrophage-derived soluble factors / L. Saldaña, F. Bensiamar, G. Vallés, [et al.] // *Stem Cell Res Ther.* – 2019. – Vol. 10. – Article number 58. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1156-6>.

151. Impaired glucose-stimulated insulin secretion is coupled with exocrine pancreatic lesions in the Cohen diabetic rat / S. Weksler-Zangen, I. Raz, S. Lenzen, [et al.] // *Diabetes.* – 2008. – Vol. 57 (2). – P. 279-287. doi:10.2337/db07-0520.

152. Impaired insulin secretion and increased insulin sensitivity in familial maturity-onset diabetes of the young 4 (insulin promoter factor 1 gene) / A.R. Clocquet, J.M. Egan, D.A. Stoffers, [et al.] // *Diabetes.* – 2000, nov. – Vol. 49 (11). – P. 1856-64.

153. Improved glucose tolerance and acinar dysmorphogenesis by targeted expression of transcription factor PDX-1 to the exocrine pancreas / R.S. Heller, D.A. Stoffers, T. Bock [et al.] // *Diabetes.* – 2001. – Vol. 50. – P. 1553-1561.

154. Increased number of islet associated macrophages in type 2 diabetes / J.A. Ehses, A. Perren, E. Eppler [et al.] // *Diabetes.* – 2007. – Vol. 56. – P. 2356-2370.

155. Independent development of pancreatic alpha- and beta-cells from neurogenin3-expressing precursors: a role for the notch pathway in repression of premature differentiation / J. Jensen, R.S. Heller, T. Funder-Nielsen, [et al.] // *J. Diabetes.* – 2000. – V.19. – P. 163-176.

156. Inflammatory cytokines in type 2 diabetes mellitus as facilitators of hypercoagulation and abnormal clot formation / S.N. Randeria, G.J.A. Thomson, T.A. Nell, [et al.] // *Cardiovascular Diabetology.* – 2019, Jun 4. – Vol. 18(1). – P. 72. doi: 10.1186/s12933-019-0870-9.

157. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis / L. Arnold, A. Henry, F. Poron, [et al.] // *J Exp Med.* – 2007. – Vol. 204 (5). – P.1057-1069.

158. Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDDM2 locus / P. Vafiadis, S.T. Bennett, J.A. Todd, [et al.] // *Nat Genet.* – 1997, Mar. – Vol. 15(3). – P. 289-292.
159. Insulin gene expression and insulin synthesis in mammalian neuronal cells / S.U. Devaskar, S.J. Giddings, P.A. Rajakumar, [et al.] // *J Biol Chem.* – 1994. – Vol. 269. – P. 8445-8454.
160. Insulin in Invertebrates and Cyclostomes / S. Falkmer, S. Emdin, N. Havu, [et al.] // *Integr Comp Biol.* – 1973. – Vol. 13. – P. 625-638.
161. Insulin is released from rat brain neuronal cells in culture / D.W. Clarke, L. Mudd, F.T. Boyd, [et al.] // *J Neurochem.* – 1986. – Vol. 47. – P. 831-836.
162. Insulin is ubiquitous in extrapancreatic tissues of rats and humans / J.L. Rosenzweig, J. Havrankova, M.A. Lesniak, [et al.] // *PNAS.* – 1980. – Vol. 77(1). – P. 572-576.
163. Insulin-Producing Acinar Cells in Adult Human Pancreas / L. Yu, J.-X. Luo, J.-L. Wei, [et al.] // *Pancreas.* – 2014, May. – Vol. 43(4). – P. 592-6. 10.1097/MPA.0000000000000079.
164. Insulin-Producing Cells Differentiated from Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells In Vitro Ameliorate Streptozotocin-Induced Diabetic Hyperglycemia / Y. Xin, X. Jiang, Y. Wang, [et al.] // *PLoS One.* – 2016, Jan 12. – Vol. 11(1). – P. e0145838. doi: 10.1371/journal.pone.0145838.
165. International Expert Committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes / International Expert Committee // *Diabetes care.* – 2009. – Vol. 32 (7). – P. 1327-1334. <https://doi.org/10.2337/dc09-9033>.
166. Intraislet Pancreatic Ducts Can Give Rise to Insulin-Positive Cells / J. Wiersch, S. Tulachan, [et al.] // *Endocrinology.* – 2016, Jan. – Vol. 157 (1). – P. 166-75. doi: 10.1210/en.2015-1175.
167. In vitro cultivation of human islets expanded ductal tissue / S. Bonner-Weir, M. Taneja, G.C. Weir, [et al.] // *Proc Natl Acad Sci.* – 2000. – Vol. 97(14). – P. 7999-8004. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.14.7999>.

168. In vitro transdifferentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells / L. Yang, S. Li, H. Hatch, [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2002, Jun 11. – Vol. 99(12). – P. 8078-8083.

169. In vivo and in vitro characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow / D.-Q. Tang, L.-Z. Cao, B.R. Burkhardt, [et al.] // *Diabetes*. – 2004. – Vol. 53. – P. 1721-1732.

170. Inzucchi, S.E. Diagnosis of diabetes / S.E. Inzucchi // *N Engl J Med*. – 2013, Jan 10. – Vol. 368(2). P. 193.

171. Islam, M.S. Experimentally induced rodent models of type 2 diabetes / M.S. Islam, R.D. Wilson // *Methods Mol Biol*. – 2012. – Vol. 933. – P. 161-74. doi: 10.1007/978-1-62703-068-7_10.

172. 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, Jan. – Vol. 23, iss. 1. – 100775. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.100775>.

173. Islet microenvironment, modulated by vascular endothelial growth factor-A signaling, promotes β cell regeneration / M. Brissova, K. Aamodt, P. Brahmachary, [et al.] // *Cell Metabolism*. – 2014. – Vol. 19. – P. 498-511.

174. 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, J.S. Tessem // *Metabolites*. – 2020. – Vol. 10 (12). – P. 485. <https://doi.org/10.3390/metabo10120485>.

175. Jonsson, J. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice / J. Jonsson, L. Carlsson, T. Edlund, H. Edlund // *Nature*. – 1994. – Vol. 371. – P. 606-609.

176. Jukic, T. A tetrahydrophthalazine derivative "sodium nucleinate" exerts a potent suppressive effect upon LPS-stimulated mononuclear cells in vitro and in vivo / T. Jukic, M. Abidov, A. Ihan // *Collegium antropologicum*. – 2011, Dec. – Vol. 35, iss. 4. – P. 1219-1223.

177. Kalra, N. Association of stem cell factor and high-sensitivity C reactive protein concentrations in crevicular fluid and serum in patients with chronic periodontitis with and without type 2 diabetes / N. Kalra, A.R. Pradeep, N. Priyanka, M. Kumari // *J Oral Sci.* – 2013, Mar. – Vol. 55(1). – P. 57-62.

178. Kazutoshi, T. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors / T. Kazutoshi, Y. Shinya // *CELL.* – 2006. – V. 126, iss. 4. – P. 663-676.

179. Kim, J.J. TNF-alpha-induced ROS production triggering apoptosis is directly linked to Romo1 and Bcl-X(L) / J.J. Kim, S.B. Lee, J.K. Park, Y.D. Yoo // *Cell Death and Differentiation.* – 2010, Sep. – Vol. 17 (9). – P. 1420-34. doi: 10.1038/cdd.2010.19.

180. Kim, S.K. Intercellular signals regulating pancreas development and function / S.K. Kim, M. Hebrok // *Genes Dev.* – 2001. – Vol. 15. – P. 111-127.

181. Knight, S. Pancreas transplantation / S. Knight, T. Vogel, P. Friend // *Transplantation* – 2014, July 1. – Vol. 32, iss. 7. – P. 383-388. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2014.05.001>.

182. Kraakman, M.J. Macrophage polarization in obesity and type 2 diabetes: weighing down our understanding of macrophage function? / M.J. Kraakman, A.J. Murphy, K. Jandeleit-Dahm, H.L. Kammoun // *Frontiers in Immunology.* – 2014, Sep. – Vol. 5(1). – P. 470. doi: 10.3389/fimmu.2014.00470.

183. 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 // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* – 2016. – Vol. 73. P. – 82-98.

184. Kuo, T. Regulation of Glucose Homeostasis by Glucocorticoids. / T. Kuo, A. McQueen, T.C. Chen, J.C. Wang // *Advances in Experimental Medicine and Biology.* – 2015. – Vol. 872. – P. 99-126. doi.org/10.1007/978-1-4939-2895-8_5.

185. Lechner, A. Stem/progenitor cells derived from adult tissues: potential for the treatment of diabetes mellitus / A. Lechner, J.F. Habener // *Am J Physiol Endocrinol Metab.* – 2003, Feb. – Vol. 284 (2). – E259-66. doi: 10.1152/ajpendo.00393.2002. PMID: 12531740.

186. Lewis, E. Replacing Animal Models: A Practical Guide to Creating and Using Culture-based Biomimetic Alternatives Chapter 3: Pancreatic Islets. P. 24. / E. Lewis. – John Wiley & Sons. P. 2012-214. 10.1002/9781119940685.ch3.

187. Liew, C.-G. Generation of insulin-producing cells from pluripotent stem cells: from the selection of cell sources to the optimization of protocols / C.-G. Liew // The Review of Diabetic Studies. – 2010, Sum. – Vol. 7 (2). – P. 82-92. doi: 10.1900/RDS.2010.7.82.

188. Lineage tracing evidence for transdifferentiation of acinar to duct cells and plasticity of human pancreas / I. Houbracken, E. de Waele, J. Lardon, [et al.] // Gastroenterol. – 2011. – P. 141:731–741. doi: 10.1053/j.gastro.2011.04.050. 741.e1-4.

189. Long-Term Correction of Diabetes in Mice by In Vivo Reprogramming of Pancreatic Ducts / Y. Wang, C. Dorrell, W.E. Naugler, [et al.] // Molecular Therapy. – 2018, May 2. – Vol. 26 (5). – P. 1327-1342. doi:10.1016/j.ymthe.2018.02.014.

190. Macrophage function in tissue repair and remodeling requires IL–4 or IL–13 with apoptotic cells / L. Bosurgi, Y.G. Cao, M. Cabeza-Cabrero, [et al.] // Science. – 2017, 09 Jun. – Vol. 356, iss. 6342. – P. 1072-1076. DOI: 10.1126/science.aai8132.

191. Macrophage Membrane Molecules: Markers of Tissue Differentiation and Heterogeneity / L. Martinez-Pomares, N. Platt, A.J. Mcknight, [et al.] // Immunobiology. – 1996. – Vol. 195, iss. 4-5. – P. 407-416. ISSN 0171-2985. [https://doi.org/10.1016/S0171-2985\(96\)80012-X](https://doi.org/10.1016/S0171-2985(96)80012-X).

192. Mechanisms of β -Cell Death in Type 2 Diabetes / Donath M.Y., [et al.] // Diabetes 2005 Dec; 54 (suppl 2): S108-S113. https://doi.org/10.2337/diabetes.54.suppl_2.S108.

193. Metabolic phenotyping guidelines: assessing glucose homeostasis in rodent models / J.E. Bowe, Z.J. Franklin, A.C. Hauge-Evans, [et al.] // J Endocrinol. – 2014. – Vol. 222 (3). – P. G13-G25. doi:10.1530/JOE-14-0182.

194. Metabolic syndrome markers in wistar rats of different ages / A.C. Ghezzi, L.T. Cambri, J.D. Botezelli, [et al.] // Diabetology & Metabolic Syndrome. – 2012, Apr 27. – Vol. 4(1). – P. 16. <https://doi.org/10.1186/1758-5996-4-16>.

195. Method for obtaining 5-amino 2,3-dihydrophthalazine-1,4-dione alkali metal salts and their use in medicine / A.M. Abidov, A.S. Ishmuratov, I.G. Danilova // Patent US8536171B2, 17.09.2013.
196. Missense mutations in the insulin promoter factor-1 gene predispose to type 2 diabetes / W.M. Macfarlane, T.M. Frayling, S. Ellard, [et al.] // J Clin Invest. – 1999. – Vol. 104. – P. 33-39.
197. Modulation of Inflammatory Response Improves Myocardial Infarct Healing in Rats / A.P. Sarapultsev, O.N. Chupakhin, P.A. Sarapultsev, [et al.] // Current Pharmaceutical Design. – 2014. – Vol. 20, iss. 12. – P. 1980-1986.
198. Molecular Basis of Pancreas Development and Function / Editors J.F. Habener, M. Hussain. – Springer Science+Business Media, 2001. – 411 p.
199. Monocyte and macrophage plasticity in tissue repair and regeneration / A. Das, M. Sinha, S. Datta [et al.] // Am J Pathol. – 2015, Oct. – Vol. 185(10). – P. 2596-606.
200. Mosser, D.M. Exploring the full spectrum of macrophage activation / D.M. Mosser, J.P. Edwards // Nature Review Immunology. – 2008, Dec. – Vol. 8 (12). – P. 958-69.
201. Mouse pancreatic islet macrophages use locally released ATP to monitor beta cell activity / J.R. Weitz, M. Mahmutova, J. Almaca, J. Stertmann, [et al.] // Diabetologia. – 2018. – Vol. 61. – P. 182-192. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4416-y>.
202. Murakami, T. Microcirculation of the rat pancreas, with special reference to the insulo-acinar portal and insulo-venous drainage systems: a further scanning electron microscopy study of corrosion casts / T. Murakami, T. Fujita // Archives of Histology and Cytology. – 1992. – Vol. 55 (5). – P. 453-476.
203. M2 macrophages promote beta-cell proliferation by up-regulation of SMAD7 / X. Xiao, I. Gaffar, P. Guo, [et al.] // Proceedings of the National Academy of Science USA. – 2014, Apr 1. – Vol. 111 (13). – P. E1211-20.
204. Nagasao, J. Centroacinar and intercalated duct cells as potential precursors of pancreatic endocrine cells in rats treated with streptozotocin / J. Nagasao, K. Yoshioka, H. Amasaki, K. Mutoh // Ann Anat. – 2003, Jun. – Vol. 185(3). – P. 211-6.

205. Naidoo, V. Cell- and tissue-specific epigenetic changes associated with chronic inflammation in insulin resistance and type 2 diabetes / V. Naidoo, M. Naidoo, M. Ghai // *Scand J Immunol.* – 2018. – 88(6):e12723. doi: 10.1111/sji.12723.

206. Navarro, J.F. Diabetes, Inflammation, Proinflammatory Cytokines and Diabetic Nephropathy / J.F. Navarro, C. Mora // *The Scientific World Journal.* – 2006. – Vol. 6. – P. 908-917.

207. Neurogenin3 Activation Is Not Sufficient to Direct Duct-to-Beta Cell Transdifferentiation in the Adult Pancreas / X. Xiao, P. Guo, C. Shiota, [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry.* – 2013. – Vol. 288, № 35. – P. 25297-25308.

208. Neurogenin3 phosphorylation controls reprogramming efficiency of pancreatic ductal organoids into endocrine cells / R. Azzarelli, S. Rulands, S. Nestorova, [et al.] // *Scientific reports.* – 2018, 18 Oct. – Vol. 8. – Article № 15374. doi:10.1038/s41598-018-33838-5.

209. Neutralization by insulin of the hypertensive effect of dermcidin isoform-2: an environmentally induced diabetogenic and hypertensive protein / R. Ghosh, S. Bank, R. Bhattacharya, [et al.] // *Cardiol Res Pract.* – 2014. – 2014: 412815. doi: 10.1155/2014/412815. PMID: 24649391; PMCID: PMC3932286.

210. New concepts of IL-10-induced lung fibrosis: fibrocyte recruitment and M2 activation in a CCL2/ CCR2 axis / L. Sun, M.C. Louie, M. Kevin, [et al.] // *American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology.* – 2011. – Vol. 300 (3). – L341-53. doi: 10.1152/ajplung.00122.2010.

211. New metabolic index use potentialities in evaluation of insulin resistance in clinical practice / G.E. Roytberg, J.V. Dorosh, O.O. Sharkhun, [et al.] // *Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии.* – 2014. – Vol. 10(3). – P. 264-274.

212. Noguchi, H. PDX-1 protein containing its own Antennapedia-like protein transduction domain can transduce pancreatic duct and islet cells / H. Noguchi, H. Kaneto, G.C. Weir, S. Bonner-Weir // *Diabetes.* – 2003. – Vol. 52. – P. 1732-1737.

213. Nunemaker, C.S. Considerations for Defining Cytokine Dose, Duration and Milieu That Are Appropriate for Modeling Chronic Low-Grade Inflammation in Type 2

Diabetes / C.S. Nunemaker // Journal of Diabetes Research. – 2016. – Article ID 2846570. <https://doi.org/10.1155/2016/2846570>.

214. Odegaard, J.I. Mechanisms of macrophage activation in obesity-induced insulin resistance / J.I. Odegaard, A. Chawla // Nat Clin Pract Endocrinol Metab. – 2008. – Vol. 4 (11). – P. 619 - 626. doi:10.1038/ncpendmet0976.

215. Ohtani, O. Microcirculation of the pancreas: a correlative study of intravital microscopy with scanning electron microscopy of vascular corrosion casts / O. Ohtani // Arch Histol Jap. – 1983. – Vol. 46. – P. 315-325.

216. Olefsky, J.M. Macrophages, inflammation, and insulin resistance / J.M. Olefsky, C.K. Glass // Annual Review of Physiology. – 2010. – Vol. 72. – P. 219-46. 10.1146/annurev-physiol-021909-135846.

217. Orci, L. Macro- and micro- domains in the endocrine pancreas / L. Orci // Diabetes. – 1982. – № 31. – P. 538-565.

218. Palmitate-induced IL6 expression ameliorated by chicoric acid through AMPK and SIRT1-mediated pathway in the PBMCs of newly diagnosed type 2 diabetes patients and healthy subjects / Z.A. Sadeghabadi, N. Ziamajidi, R. Abbasalipourkabir, [et al.] // Cytokine. – 2019, Jan 25. – 116: 106-114. Doi: 10.1016/j.cyto.2018.12.012.

219. Pancreatic Acinar Cells Submitted to Stress Activate TNF- α Gene Expression. Biochemical and biophysical research communications / M.I. Vaccaro, A. Ropolo, D. Grasso, [et al.] // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2000. – Vol. 268, iss. 2. – P. 485-90. 10.1006/bbrc.2000.2151.

220. Pancreatic duodenal homeobox 1 protein is a novel beta-cell-specific autoantigen for type I diabetes / S.W. Li, V. Koya, Y. Li, W. Donelan // Laboratory Investigation. – 2010, Jan. – Vol. 90 (1). – P. 31-9. doi: 10.1038/labinvest.2009.116.

221. Pancreatic Inflammation Redirects Acinar to Beta Cell Reprogramming / H.W. Clayton, A.B. Osipovich, J.S. Stancill, [et al.] // Cell Rep. – 2016, Nov. – Vol. 17(8). – P. 2028-2041. doi: 10.1016/j.celrep.2016.10.068.

222. Pandiri, A.R. Overview of exocrine pancreatic pathobiology / A.R. Pandiri // Toxicologic Pathology. – 2014, Jan. – Vol. 42 (1). – P. 207-216.

223. Park, I.-S. Characterization of the endocrine cells in the pancreatic-bile duct system of the rat / I.-S. Park, M. Bendayan // *Anat Rec.* – 1992. – Vol. 232. – P. 247-256.

224. Partial recovery from alloxan-induced diabetes by sodium phthalhydrazide in rats / I.G. Danilova, T.S. Bulavintceva, I.F. Gette, [et al.] // *Biomedicine and Pharmacotherapy.* – 2017. – Vol. 95. – P. 103-110.

225. PDX-1 and MafA Play a Crucial Role in Pancreatic β -Cell Differentiation and Maintenance of Mature β -Cell Function / H. Kaneto, T. Miyatsuka, D. Kawamori, [et al.] // *Endocrine Journal.* – 2008. – Vol. 55, iss. 2. – P. 235-252. <https://doi.org/10.1507/endocrj.K07E-041>.

226. PDX-1 and Msx-2 expression in the regenerating and developing pancreas / M.R. Kritzik, E. Jones, Z. Chen, [et al.] // *J Endocrinol.* – 1999, Dec. – Vol. 163 (3). – P. 523-30. doi: 10.1677/joe.0.1630523. PMID: 10588826.

227. Peacock, I. Glycosylated haemoglobin: measurement and clinical use / I. Peacock // *J Clin Pathol.* – 1984, Aug. – Vol. 37 (8). – P. 841-51.

228. Plasticity of Adult Human Pancreatic Duct Cells by Neurogenin3-Mediated Reprogramming / N. Swales, G.A. Martens, S. Bonne, [et al.] // *PLoS One.* – 2012, May 14. – Vol. 7(5). – P. e37055. doi: 10.1371/journal.pone.0037055.

229. Plesner, A. Advances and challenges in islet transplantation: islet procurement rates and lessons learned from suboptimal islet transplantation / A. Plesner, C.B. Verchere // *Journal of transplantation.* – 2011, Dec. – Vol. 2011. – P. 979527. doi:10.1155/2011/979527.

230. Poitout, V. Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction / V. Poitout, R.P. Robertson // *Endocr Rev.* – 2008. – Vol. 29. – P. 351-366.

231. Progenitor cells and TNF-alpha involvement during morphological changes in pancreatic islets of obese mice / A.A. Thole, A.C.S. Rodrigues-Cunha, S.N. Carvalho, [et al.] // *Tissue & cell.* – 2012, Aug. – Vol. 44 (4). – P. 238-48. 10.1016/j.tice.2012.04.001.

232. Proinflammatory Cytokines Induce Endocrine Differentiation in Pancreatic Ductal Cells via STAT3-Dependent NGN3 Activation / I.A. Valdez, E. Dirice, M.K. Gupta, [et al.] // *Cell Rep.* – 2016, Apr 19. – 15(3). – P. 460-470.

233. PubChem Compounds [электр. ресурс]. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9794222> (дата обращения 16.03.2021)
234. Puri, S. Cellular plasticity within the pancreas – lessons learned from development / S. Puri, M. Hebrok // *Developmental cell*. – 2010. – Vol. 18 (3). – P. 342-356. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.02.005>.
235. Qin, Y. The Regulatory Role of IFN- γ on the Proliferation and Differentiation of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells / Y. Qin, C. Zhang // *Stem Cell Reviews and Reports*. – 2017, Dec. – Vol. 13 (6). – P. 705-712. DOI: 10.1007/s12015-017-9761-1.
236. Rakieten, L. Studies on the diabetogenic action of Streptozotocin (NSC-37917) / L. Rakieten, M.L. Rakieten, M.V. Nadkarni // *Cancer Chemother Rep*. – 1963. – Vol. 29. – P. 91-98. PMID: 13990586.
237. Rat endocrine pancreatic development in relation to two homeobox gene products (Pdx-1 and Nkx 6.1) / A. Oster, J. Jensen, P. Serup, [et al.] // *J Histochem Cytochem*. – 1998. – Vol. 46. – P. 707-15.
238. Recapitulation of elements of embryonic development in adult mouse pancreatic regeneration / J.N. Jensen, E. Cameron, M.V.R. Garay, [et al.] // *Gastroenterology*. – 2005, Mar. – Vol. 128 (3). – P. 728-41. doi:10.1053/j.gastro.2004.12.008.
239. Recruitment of Stem and Progenitor Cells from the Bone Marrow Niche Requires MMP-9 Mediated Release of Kit-Ligand / B. Heissig, K. Hattori, S. Dias, [et al.] // *Cell*. – 2002, May 31. – Vol. 109, iss. 5. – P. 625-637.
240. Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells / V.K. Ramiya, M. Maraist, K.E. Arfors, [et al.] // *Nat Med*. – 2000. – Vol. 6. – P. 278-282.
241. Risk factors for diabetes mellitus and early insulin resistance in chronic hepatitis C / J.M. Petit, J.B. Bour, C. Galland-Jos, [et al.] // *J Hepatol*. – 2001. – Vol. 35. – P. 279-283.
242. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease: Chapter 3. –Tissue renewal, regeneration, and repair / V. Kumar, A.K. Abbas, N. Fausto, J.C. Aster. – Saunders, 2010. – 1464 pp.

243. Role of Reactive Oxygen Species in Tumor Necrosis Factor-alpha Induced Endothelial Dysfunction / X. Chen, B.T. Andresen, M. Hill // *Current Hypertension Review*. – 2008, Nov. – Vol. 4 (4). – P. 245-255. doi: 10.2174/157340208786241336.

244. Rosenberg, L. In vivo cell transformation: neogenesis of beta cells from pancreatic ductal cells / L. Rosenberg // *Cell Transplantation*. – 1995, Jul-Aug. – Vol. 4 (4). – P. 371-83.

245. Samson S.L., Chan L. Gene therapy for diabetes: reinventing the islet / S.L. Samson, L. Chan // *Trends Endocrinol Metab*. – 2006, Apr. – Vol. 17(3). – P. 92-100. doi: 10.1016/j.tem.2006.02.002.

246. Sarvetnick, N.E. Regeneration of pancreatic endocrine cells in interferon-gamma transgenic mice / N.E. Sarvetnick, D. Gu. // A.I. Vinik, D.J. Sirman (eds) *Pancreatic Islet Cell Regeneration and Growth. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 321. Boston: Springer, 1992. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3448-8_10.

247. Saturated fatty acid and TLR signaling link beta cell dysfunction and islet inflammation / K. Eguchi, I. Manabe, Y. Oishi-Tanaka, [et al.] // *Cell Metab*. – 2012. – Vol. 15. – P. 518-533.

248. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair / J.S. Duffield, S.J. Forbes, C.M. Constandinou, [et al.] // *J Clin Invest*. – 2005, Jan 3. – Vol. 11 (1). – P. 56-65.

249. Self-antigen-presenting cells expressing diabetes-associated autoantigens exist in both thymus and peripheral lymphoid organs / A. Pugliese, D. Brown, D. Garza, [et al.] // *The Journal of clinical investigation*. – 2001. – Vol. 107 (5). – P. 555-564. <https://doi.org/10.1172/JCI10860>.

250. Shen, S.Q. Expression of the stem cell factor in fibroblasts, endothelial cells, and macrophages in periapical tissues in human chronic periapical diseases / S.Q.Shen, R. Wang, S.G. Huang // *Genet Mol Res*. – 2017, Mar 8. – Vol. 16 (1). doi: 10.4238/gmr16019394. PMID: 28290616.

251. Shoelson, S.E. Inflammation and insulin resistance / S.E. Shoelson, J. Lee, A.B. Goldfine // *J Clin Invest*. – 2006. – Vol. 116. – P. 1793-1801. doi: 10.1172/JCI29069.

252. 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 doi.org/10.1007/s00428-018-2492-0.
253. Soling, H.D. The role of insulin in the regulation of α -amylase synthesis in the rat pancreas / H.D. Soling, K.O. Unger // *Eur J Clin Invest.* – 1972, Aug. – Vol. 2, iss. 4. P. – 199-212.
254. Soria, B. Using stem cells to produce insulin / B. Soria, A. Skoudy, F.Martin // *Expert Opin. Biol. Ther.* – 2015. – Vol. 15(10). – P. 1-21.
255. Standards of Medical Care in Diabetes-2018 // American Diabetes Association. *Diabetes Care.* – 2018, Jan. – 41(Suppl 1). – P. S13-S27.
256. Stoffers, D.A. Insulin promoter factor-1 gene mutation linked to early-onset type 2 diabetes mellitus directs expression of a dominant negative isoprotein / D.A. Stoffers, V. Stanojevic, J.F. Habener // *J Clin Invest.* – 1998. – 102. – P. 232-241.
257. Suckale, J. Pancreas islets in metabolic signaling-focus on the beta-cell / J. Suckale, M. Solimena // *Frontiers in Bioscience.* – 2008, Febr. – № 13 (18). – P. 7156-71.
258. Suman, B. Extra pancreatic synthesis of insulin / B. Suman, B. Sarbashri, G. Rajeshwary, S. Asru // *Integrative Obesity and Diabetes.* – 2015. – Vol. 2 (1). – P. 176-179. Doi: 10.15761/IOD.1000138.
259. Sustained high glucose exposure sensitizes macrophage responses to cytokine stimuli but reduces their phagocytic activity / S. Pavlou, J. Lindsay, R. Ingram // *BMC Immunology.* – 2018. – Vol. 19, Article number: 24.
260. Swaroop, J. Association of TNF- α with insulin resistance in Type 2 diabetes mellitus / J. Swaroop, D. Rajarajeswari, J. Naidu // *The Indian journal of medical research.* – 2012. – Vol. 135 (1). – P. 127-30. 10.4103/0971-5916.93435.
261. Swartz, F.J. An islet of Langerhans located within the epithelium of a human pancreatic duct / F.J. Swartz, P.H. Carstens // *Histology and Histopathology.* – 1986, Apr. – Vol. 1 (2). – P.111-7.

262. System inflammation in the pathogenesis of metabolic syndrome and associated with it disorders / I.D. Beshpalova, N.V. Rjasantseva, V.V. Kalyuzhin [et al.] // Siberian medicine journal. – 2013. – № 2. – P. 5-9.

263. Szkudelski, T. Streptozotocin–nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model / T. Szkudelski // Experimental Biology and Medicine. – 2012, May. – Vol. 237, iss. 5. – P. 481-490.

264. Szkudelski, T. The mechanism of streptozotocin and alloxan action in beta-cells of the rat pancreas / T. Szkudelski // Physiol. Res. 2001. – № 50. – P. 536-546.

265. Talchai, C. Pancreatic β cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic β cell failure / C. Talchai, S. Xuan, H.V. Lin // Cell. – 2012, Sep 14. – Vol. 150 (6). – P. 1223-34.

266. Tesch, G.H. Role of macrophages in complications of type 2 diabetes / G.H. Tesch // Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. – 2007, Oct. – Vol. 34, iss. 10. – P. 1016-1019. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2007.04729.x>

267. TGF-beta 1 influences the relative development of the exocrine and endocrine pancreas in vitro / F. Sanvito, P.L. Herrera, J. Huarte, [et al.] // Development. – 1994. – Vol. 120. – P. 3451-3462.

268. 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.

269. The forkhead transcription factor Foxo1 links insulin signaling to Pdx1 regulation of pancreatic beta cell growth / T. Kitamura, J. Nakae, Y. Kitamura, [et al.] // Journal of Clinical Investigation. – 2002, Dec. – Vol. 110 (12). – P. 1839-47.

270. The glucose-induced synthesis of insulin in liver / R. Ghosh, R. Ghosh, S.K. Karmohapatra, [et al.] // Endocrine. – 2010, Oct 23. – Vol. 38 (2). – P. 294-302. doi: 10.1007/s12020-010-9388-3. Epub 2010 Oct 23. Erratum in: Endocrine. 2012, Apr. – 41 (2). – 345. PMID: 20972731.

271. The homeodomain protein IDX-1 increases after an early burst of proliferation during pancreatic regeneration / A. Sharma, D.H. Zangen, P. Reitz, [et al.] // Diabetes. – 1999. – Vol. 48. – P. 507-513.

272. The macrophage F4/80 receptor is required for the induction of antigen-specific efferent regulatory T cells in peripheral tolerance / H.H. Lin, D.E. Faunce, M. Stacey, [et al.] // *The Journal of experimental medicine*. – 2005. – Vol. 201 (10). – P. 1615-1625. <https://doi.org/10.1084/jem.20042307>.

273. *The Pancreas: Biology, Pathobiology and Disease*, Second edition, edited by Vay Liang W. Go, [et al.]. – New York: Raven Press Ltd., 1993. – P. 789-802.

274. The pancreatic ductal epithelium serves as a potential pool of progenitor cells / S. Bonner-Weir, E. Toschi, A. Inada, [et al.] // *Pediatr Diabetes*. – 2004. – Vol. 5, suppl 2. – P. 16-22. doi: 10.1111/j.1399-543X.2004.00075.x. PMID: 15601370.

275. The Role of Inflammation in Diabetes: Current Concepts and Future Perspectives / S. Tsalamandris, A.S. Antonopoulos, E. Oikonomou, [et al.] // *European cardiology*. – 2019. – Vol. 14 (1). – P. 50-59. doi:10.15420/ecr.2018.33.1.

276. The role of macrophage phenotype in vascularization of tissue engineering scaffolds / K.L. Spiller, R.R. Anfang, K.J. Spiller, J. Ng, [et al.] // *Biomaterials*. – 2014, May. – 35 (15). – P. 4477-88.

277. The SCF/c-KIT system in the male: Survival strategies in fertility and cancer / H.J. Cardoso, M.I. Figueira, S. Correia // *Mol Reprod Dev*. – 2014, Dec. – Vol. 81 (12). – P. 1064-79.

278. The time is right for a new classification system for diabetes: rationale and implications of the β -cell-centric classification schema / S.S. Schwartz, S. Epstein, B.E. Corkey, [et al.] // *Diabetes Care*. – 2016, Feb. – Vol. 39 (2). – 179-186.

279. TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) promotes beta cell neogenesis from pancreatic ductal epithelium in adult mice / F. Wu, L. Guo, A. Jakubowski, [et al.] // *PLOS ONE*. – 2013. – Vol. 8 (8). – P. e72132. doi:10.1371/journal.pone.0072132 PMID:23991053.

280. TNF- α Increases Production of Reactive Oxygen Species through Cdk5 Activation in Nociceptive Neurons / R. Sandoval, P.Lazcano, F. Ferrari, [et al.] // *Frontiers in Physiology*. – 2018, Feb 6. – Vol. 9. – P. 65. doi: 10.3389/fphys.2018.00065.

281. Transfer of diabetes in mice prevented by blockade of adhesion-promoting receptor on macrophages / P. Hutchings, H. Rosen, L. O'Reilly, [et al.] // *Nature*. – 1990. – Dec 13. – Vol. 348 (6302). – P. 639-42.

282. Tritschler, S. Systematic single-cell analysis provides new insights into heterogeneity and plasticity of the pancreas / S. Tritschler, F.J. Theis, H. Lickert, A. Böttcher // *Molecular Metabolism*. – 2017, Sept. – Vol. 6, iss. 9. – Pages 974-990.

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

284. Tsuchitani, M. A comparison of the anatomical structure of the pancreas in experimental animals / M. Tsuchitani, J. Sato, H. Kokoshima // *J Toxicol Pathol*. – 2016, Jul. – Vol. 29 (3). P. 147-154. doi: 10.1293/tox.2016-0016.

285. Van Noorden, S. Gut-islet endocrinology-some evolutionary aspects / S. Van Noorden, S. Falkmer // *Invest Cell Pathol*. – 1980, Jan-Mar. – Vol. 3 (1). – P. 21-35. PMID: 6156146.

286. Veeranjanyulu1, C. Effect of Streptozotocin (STZ) on Pancreatic Carcinogenesis / C. Veeranjanyulu1, G. Subrahmanayam // *Canc Therapy & Oncol Int J*. – 2017. – Vol. 7 (5): CTOIJ.MS.ID.555725.

287. Wallace, T.M. Use and abuse of HOMA modeling / T.M. Wallace, J.C. Levy, D.R. Matthews // *Diabetes Care*. – 2004, Jun. – Vol. 27 (6). – P. 1487-95.

288. Wang, R.N. Beta-cell proliferation in normal and streptozotocin-treated newborn rats: site, dynamics and capacity / R.N. Wang, L. Bouwens, G. Klöppel // *Diabetologia*. – 1994. – Vol. 37. – P. 1088-1096.

289. Wang, R.N. Duct-to-islet cell differentiation and islet growth in the pancreas of ductligated adult rats / R.N. Wang, G. Klöppel, L. Bouwens // *Diabetologia*. – 1995. – Vol. 38. – P. 1405-1411.

290. Weir, G.C. Transcription factor abnormalities as a cause of beta cell dysfunction in diabetes: a hypothesis / G.C. Weir, A. Sharma, D.H. Zangen, S. Bonner-Weir // *Acta Diabetol*. – 1997. – Vol. 34. – P. 177-184.

291. Whole-body imaging with single-cell resolution by tissue decolorization / K. Tainaka, S.I. Kubota, T.Q. Suyama, [et al.] // *Cell*. – 2014, Nov 6. – 159(4). – P. 911-24.
292. Wicks, K. Myeloid cell dysfunction and the pathogenesis of the diabetic chronic wound / K. Wicks, T. Torbica, K.A. Mace // *Seminars in Immunology*. – 2014. – Vol. 26 (4). – P. 341-53.
293. World Health Organization. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: report of a WHO consultation: P. 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. – Geneva, 1999.
294. World Health Organization, International Diabetes Federation. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycaemia. Report of a WHO/IDF consultation. Geneva. – 2006.
295. Wynn, T.A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis / T.A. Wynn // *Journal of Pathology*. – 2008. – Vol. 214 (2). – P. 199-210.
296. Wynn, T.A. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis / T.A. Wynn, K.M. Vannella // *Immunity*. – 2016, Mar 15. – Vol. 44 (3). – P. 450-462.
297. Wynn, T.A. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis / T.A. Wynn, L. Barron // *Seminars in Liver Disease*. – 2010, Aug. – Vol. 30 (3). – P. 245-57.
298. Yamamoto, M. Treatment for hyperglycemia promotes pancreatic regeneration in rats without CCK-1 receptor gene expression / M. Yamamoto, D.M. Jia, K. Fukumitsu, M. Otsuki // *Pancreas*. – 2003, May. – Vol. 26 (4). – P. 368-74. doi: 10.1097/00006676-200305000-00010. PMID: 12717270.
299. Yoshida, Y. Induced Pluripotent Stem Cells 10 Years Later: For Cardiac Applications / Y. Yoshida, S. Yamanaka // *Circ Res*. – 2017, Jun 9. – Vol. 120 (12). – P. 1958-1968. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311080.
300. Young, H.A. IFN-gamma: recent advances in understanding regulation of expression, biological functions, and clinical applications / H.A. Young, J.H. Bream // *Current Topics in Microbiology and Immunology*. – 2007. – Vol. 316. – P. 97-117.

301. Yumiko, O. Macrophages in inflammation, repair and regeneration / O. Yumiko, I. Manabe // *International Immunology*. – 2018, Nov. – Vol. 30, iss. 11. – P. 511-528. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxy054>.
302. Zhou, Q. Pancreas regeneration / Q. Zhou, D.A. Melton // *Nature*. – 2018. – Vol. 557. – P. 351-358.
303. Zhu, Y. PDX1, Neurogenin-3, and MAFA: critical transcription regulators for beta cell development and regeneration / Q. Liu, Z. Zhou, Y. Ikeda // *Stem Cell Res Ther*. – 2017: 8. – P. 240. Published online 2017 Nov 2. doi: 10.1186/s13287-017-0694-z.
304. β -Cell neogenesis induced by adenovirus-mediated gene delivery of transcription factor pdx-1 into mouse pancreas / H. Taniguchi, E. Yamato, F. Tashiro, [et al.] // *Gene Therapy*. – 2003. – Vol. 10. – P. 15-23.