

ВЛИЯНИЕ МОДУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ МАКРОФАГОВ НА СОСТОЯНИЕ ИНСУЛИНОЦИТОВ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА

© 2018 г. В. А. Черешнев^{1,2}, А. В. Белоусова¹, К. В. Соколова^{1,2},
И. Г. Данилова^{1,2*}, И. Ф. Гетте^{1,2}

*E-mail: ig-danilova@yandex.ru

¹ФБГУН «Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения
Российской академии наук», Екатеринбург, Россия;

²ГБОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента
России Б. Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия

Модуляция активности макрофагов посредством введения аминоталгидразида (2 мг/кг) у крыс со стрептозотоциновым сахарным диабетом 2 типа (110 мг/кг никотинамида и 65 мг/кг стрептозотоцина) сопровождалась увеличением количества и функциональной активности островковых инсулиноцитов и снижением гипергликемии.

Ключевые слова: макрофаги, стрептозотоциновый диабет, инсулиноциты

DOI: 10.31857/S102872210002674-6

Адрес: 620049 Екатеринбург, ул. Первомайская, д. 106, ФБГУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения РАН, лаборатория морфологии и биохимии. Данилова Ирина Георгиевна. E-mail: ig-danilova@yandex.ru

Авторы:

Черешнев В. А., д.м.н., профессор, академик, г.н.с. ФБГУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения РАН; заведующий кафедрой иммунохимии Химико-технологического института ГБОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия;

Белоусова А. В., м.н.с. лаборатории морфологии и биохимии ФБГУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения РАН; лаборант-исследователь кафедры иммунохимии Химико-технологического института ГБОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия;

Соколова К. В., лаборант-исследователь лаборатории морфологии и биохимии ФБГУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения РАН; аспирант кафедры медицинской биохимии и биофизики Института естественных наук и математики ГБОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия;

Данилова И. Г., д.б.н., доцент, заведующая лабораторией морфологии и биохимии ФБГУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения РАН; заместитель директора по науке ФБГУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения РАН; заведующая кафедрой медицинской биохимии и биофизики Института естественных наук и математики ГБОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия;

Гетте И. Ф., к.б.н., с.н.с. лаборатории морфологии и биохимии ФБГУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения РАН; с.н.с. кафедры иммунохимии Химико-технологического института ГБОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия;

Введение. Высокая частота встречаемости сахарного диабета 2 типа (СД2) обуславливает необходимость испытания на экспериментальных моделях новых лекарственных препаратов, воздействующих на патогенетические механизмы заболевания. В настоящее время наиболее распространенной моделью СД2 является введение стрептозотоцина с предварительным введением никотинамида, снижающего токсический эффект стрептозотоцина [2]. Установленная в последнее время регуляторная роль фагоцитирующих мононуклеаров в процессах восстановительного роста различных тканей, а также пластичность инсулинпродуцирующих клеток открывают возможности коррекции нарушений, имеющих место при СД2 [1, 3–5]. Ранее была показана способность моноцитов/макрофагов вырабатывать факторы роста в результате действия аминоталгидразида (АФГ), что способствовало усилению регенераторных процессов на различных экспериментальных моделях, в том числе восстановлению островковой части поджелудочной железы при моделировании сахарного диабета 1 типа [1, 3, 5].

Цель исследования – на экспериментальной модели сахарного диабета 2 типа выявить возможность коррекции нарушений островкового аппарата поджелудочной железы посредством модуляции активности макрофагов.

Материалы и методы. Эксперимент выполнен на 20 крысах линии Вистар в соответствии с принципами Директивы 2010/63/EU ЕС. Были

выделены группы по 5 животных: 1 – интактные крысы; 2 – СД2 30 суток; 3 – СД2–60 суток; 4 – СД2 и 5 – АФГ (20 внутримышечных инъекций по 2 мг/кг в течение 30 суток). Для моделирования СД2 внутрибрюшинно вводили никотинамид 110 мг/кг (производитель – SIGMA-ALDRICH, США), через 15 минут – стрептозотоцин 65 мг/кг (производитель – SIGMA-ALDRICH, США) [2]. Содержание глюкозы определяли набором готовых реактивов (производитель – «Витал Диагностикс», Санкт-Петербург), гликированного гемоглобина – набором «Диабет-тест» (производитель – ФОСФОСОРБ, Москва), оптическую плотность определяли на спектрофотометре DU800 (Beckman Coulter Int S. A., Швейцария). Содержание инсулина в плазме крови определяли набором для ИФА (Rat/Mouse Insulin ELISA; Millipore, США) с использованием прибора LAZURITE AUTOMATED ELISA SYSTEM.

Поджелудочные железы фиксировались в 10% забуференном формалине 24 часа с последующей заливкой в парафин. Срезы толщиной 2–3 мкм исследовали иммуногистохимически с использованием антител к инсулину (Anti-Rat Insulin/Proinsulin antibody; MA5-12042, ThermoScientific, США). Определяли морфометрические показатели и оптическую плотность инсулина в островках с использованием программы Видео Тест Морфология 5.0. Маркер клеточной пролиферации Ki-67 (clone MM1, Leica, Англия) определяли с использованием Autostainer DAKO, реакцию с Ki-67 – посредством высокотемпературной обработки срезов в цитратном буфере, pH 6,0; визуализацию – непрямым иммунопероксидазным методом. Подсчитывали количество β -клеток, экспрессирующих Ki-67 на 1мм².

Статистическую обработку данных проводили с применением программ MS Excel и OriginPro 9.0. Для сравнения двух независимых групп использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Различия между группами считались статистически значимыми при $P < 0,05$.

Результаты. Через 30 суток после введения никотинамида и стрептозотоцина содержание глюкозы в плазме крови животных достоверно увеличилось с $5,99 \pm 0,17$ ммоль/л до $12,11 \pm 1,03$ ммоль/л и оставалось повышенным ($12,23 \pm 0,50$ ммоль/л) к 60 суткам. В то же время достоверное накопление гликированного гемоглобина было отмечено только к 60 суткам СД2 (с $4,3 \pm 0,3\%$ у интактных крыс до $6,6 \pm 0,4\%$ у крыс группы 3). После модуляции активности макрофагов у крыс группы 4 уровень обоих по-

казателей снизился относительно показателей нелеченных животных (соответственно глюкозы до $8,53 \pm 1,44$ ммоль/л и HbA1c до $4,7 \pm 0,6\%$).

Морфометрические исследования показали, что на 30 и на 60 сутки после моделирования СД2, а также после действия АФГ количество панкреатических островков, их площадь и содержание в них общего количества клеток не изменились по сравнению с теми же показателями интактной группы. В то же время у крыс СД2 количество β -клеток в островках снизилось на 31% относительно показателя интактной группы (с 6944 ± 457 клеток/мм² до 4837 ± 642 клеток/мм²). Наряду с уменьшением количества β -клеток при развитии СД2 отмечено снижение оптической плотности инсулина в этих клетках с $1,23 \pm 0,34$ до $0,70 \pm 0,14$ условных единиц, что соответствовало понижению концентрации инсулина в плазме крови с $59,51 \pm 3,9$ до $48,73 \pm 2,3$ пг/мл. К 60 суткам СД2 (группа 3) количество β -клеток, содержание инсулина в β -клетках и в плазме крови оставались на том же уровне показателей группы 2.

После инъекций АФГ диабетическим крысам (группа 4) количество β -клеток увеличилось до 6753 ± 220 клеток/мм², оптическая плотность инсулина в β -клетках также возросла до $1,25 \pm 0,06$ условных единиц, нормализовалось содержание инсулина в плазме крови. Исследование пролиферативной активности β -клеток посредством специфического окрашивания показало, что количество делящихся β -клеток у интактных крыс незначительно. При развитии СД2 на 30 и на 60 сутки количество Ki-67+ β -клеток в пересчете на мм² площади островка увеличилось по сравнению с показателем интактной группы. Введение АФГ сопровождалось еще большим увеличением количества Ki-67+ β -клеток/мм², что соответствовало нормализации концентрации инсулина в островках и плазме крови.

Обсуждение/выводы. Модуляция активности макрофагов способствует увеличению количества β -клеток в панкреатических островках крыс со стрептозотоциновым сахарным диабетом 2 типа, в том числе за счет повышения пролиферативной активности β -клеток. Следствием регенераторных процессов в островках является снижение уровня гипергликемии и гликирования гемоглобина.

Исследования выполнены в рамках гос. задания ИИФ УрО РАН, тема № АААА-А18–118020 590 1070 и поддержаны грантом РНФ № проекта 16–15–00039.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Блинкова Н. Б., Данилова И. Г., Гетте И. Ф., Булавинцева Т. С. Реакция иммунокомпетентных клеток на структурные повреждения почки при экспериментальном аллоксановом диабете // Российский иммунологический журнал. 2017, Т. 11 (20), № 2. С. 257–258. [Blinkova N. B., Danilova I. G., Gette I. F., Bulavintseva T. S. Reaction of immunocompetent cells for structural kidney injuries at experimental alloxan diabetes // Russian Journal of Immunology. 2017, Vol. 11 (20), № 2. P. 257–258].
2. Спасов А. А., Воронкова М. П., Сингур Г. Л., Чепляева Н. И., Чепурнова М. В. Экспериментальная модель сахарного диабета типа 2 // Биомедицина. № 3. 2011. С. 12–18. [Spasov A. A., Voronkova M. P., Singur G. L., Cheplyaeva N. I., Chepurnova M. V. Experimental model of diabetes mellitus type 2 // Biomedicine. № 3. 2011. P. 12–18].
3. Danilova I. G., Bulavintseva T. S., Gette I. F., Medvedeva S. Y., Emelyanov V. V., Abidov M. T. Partial recovery from alloxan-induced diabetes by sodium phthalhydrazide in rats // Biomed Pharmacother. 2017. 21(95). P. 103–110.
4. Mezza T., Kulkarni R. N. The regulation of pre- and post-maturational plasticity of mammalian islet cell mass // Diabetologia. 2014. 57(7). P. 1291–303.
5. Sarapultsev A., Gette I., Abidov M., Sarapultsev P., Chupakhin O., & Danilova I. (2014). Effect of immune modulators on the activity of enzymes after experimental myocardial infarction (832.10). The FASEB Journal, 28(1 Supplement), 832–10.

IMPACT OF MACROPHAGE ACTIVITY MODULATION ON THE STATUS OF INSULINOCYTES AT MODELING OF DIABETES MELLITUS 2 TYPE

© 2018 V. A. Chereshnev^{1,2}, A. V. Belousova¹, K. V. Sokolova^{1,2}, I. G. Danilova^{1,2*}, I. F. Gette^{1,2}

*E-mail: ig-danilova@yandex.ru

¹Institute of Immunology and Physiology UB RAS, Yekaterinburg, Russia;

²Ural Federal University named after the first President of Russia B. N. Yeltsin, Yekaterinburg, Russia

Modulation of macrophage activity by administration of aminophthalhydrazide (2 mg / kg) in rats with streptozotocin type 2 diabetes mellitus (110 mg/kg nicotinamide and 65 mg/kg streptozotocin) was accompanied by an increase in the number and functional activity of islet insulinocytes and a decrease in hyperglycemia.

Key words: macrophages, streptozotocin diabetes, insulinocytes

Authors:

Chereshnev V. A., DrSci, Professor, Full Member Russian Academy of Science; Chief Researcher, Federal State Budget Scientific Institution “Institute of Immunology and Physiology” Ural Branch Russian Academy of Science; Head of the Department of Immunochemistry of the Chemical Technology Institute, Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Ural Federal University named after the first President of Russia Boris Yeltsin»; Yekaterinburg, Russia;

Belousova A. V., junior researcher, Laboratory of morphology and biochemistry, Federal State Budget Scientific Institution “Institute of Immunology and Physiology” Ural Branch Russian Academy of Science; laboratory assistant researcher, Department of Immunochemistry of the Chemical Technology Institute, Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Ural Federal University named after the first President of Russia Boris Yeltsin»; Yekaterinburg, Russia;

Sokolova K. V., laboratory assistant researcher, Laboratory of morphology and biochemistry, Federal State Budget Scientific Institution “Institute of Immunology and Physiology” Ural Branch Russian Academy of Science; PhD student, Chair of Medicine Biochemistry and Biophysics, Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Ural Federal University named after the first President of Russia Boris Yeltsin»; Yekaterinburg, Russia;

Danilova I. G., ☒ DrSci, Assistant Professor, Head of the Laboratory of Morphology and Biochemistry, Deputy Director for Science, Federal State Budget Scientific Institution “Institute of Immunology and Physiology” Ural Branch Russian Academy of Science; Head of the Chair of Medicine Biochemistry and Biophysics, Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Ural Federal University named after the first President of Russia Boris Yeltsin»; Yekaterinburg, Russia; 620049 Ekaterinburg, ul. Pervomayskaya, 106. E-mail: ig-danilova@yandex.ru;

Gette I. F., Ph D., major researcher, Laboratory of Morphology and Biochemistry, Federal State Budget Scientific Institution “Institute of Immunology and Physiology” Ural Branch Russian Academy of Science; major researcher, Department of Immunochemistry of the Chemical Technology Institute, Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Ural Federal University named after the first President of Russia Boris Yeltsin»; Yekaterinburg, Russia.