

ВЛИЯНИЕ МОДУЛЯЦИИ МАКРОФАГОВ НА СОСТОЯНИЕ ВНЕОСТРОВКОВОЙ ИНСУЛИНПРОДУЦИРУЮЩЕЙ СИСТЕМЫ ПРИ ГИПЕРГЛИКЕМИИ

© 2018 г. К. В. Соколова^{1,2}, А. В. Белоусова¹, И. Ф. Гетте^{1,2},
И. Г. Данилова^{1,2}, М. Т. Абидов²

¹ФГБУН «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

Поступила: 09.05.2018. Принята: 23.06.2018

Восстановление пула инсулинсинтезирующих клеток посредством модуляции макрофагальной активности может быть перспективным направлением в лечении сахарного диабета. У крыс при моделировании сахарного диабета 2 типа (110 мг/кг никотинамида и 65 мг/кг стрептозоточина) наблюдали спонтанное компенсаторное увеличение количества внеостровковых инсулинсинтезирующих клеток до 30 суток, сменяющееся уменьшением массы этих клеток к 60 суткам без усиления их функциональной активности. Модуляция активности макрофагов при введении аминофталгидразида (2 мг/кг, 20 инъекций) диабетическим крысам сопровождалась увеличением количества внеостровковых инсулиноцитов, накоплением инсулина во всех исследованных группах этих клеток и снижением гипергликемии.

Ключевые слова: макрофаги, стрептозоточинозный диабет, внеостровковые инсулинсинтезирующие клетки

DOI: 10.31857/S102872210002424-1

Адрес: 620 049 Екатеринбург, ул. Первомайская, 106, ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии УрО РАН», Соколова Ксения Викторовна.

Тел.: +7906 8007258, 8(343)3740070; E-mail: kssokolova@bk.ru

Авторы:

Соколова К. В., лаборант-исследователь лаборатории морфологии и биохимии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии УрО РАН», Екатеринбург, Россия;

Белоусова А. В., м.н.с. лаборатории морфологии и биохимии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии УрО РАН», Екатеринбург, Россия;

Гетте И. Ф., к.б.н., с.н.с. лаборатории морфологии и биохимии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии УрО РАН», Екатеринбург, Россия;

Данилова И. Г., д.б.н., доцент, зав. лабораторией морфологии и биохимии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии УрО РАН», Екатеринбург, Россия;

Абидов М. Т., д.м.н., профессор, кафедра медицинской биохимии и биофизики, ГБОУ «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Исследование возможности восстановления пула инсулинсинтезирующих клеток (ИСК)

является актуальной проблемой в лечении сахарного диабета (СД), который характеризуется гибелью β -клеток в массовом количестве в случае диабета 1 типа в результате аутоиммунного процесса и частичной потерей этих клеток при диабете 2 типа. Известно, что одновременно с гибелью островковых инсулиноцитов происходит спонтанное компенсаторное восстановление количества инсулинсинтезирующих клеток [1, 2]. Согласно последним исследованиям пути восстановления ИСК включают деление сохранившихся островковых β -клеток, их неогенез из стволовых клеток, трансдифференциацию α -клеток, δ -клеток, экзокриноцитов, эпителиоцитов протоков поджелудочной железы, моноцитов крови, а также клеток печени и кишечника в β -клетки [1, 3]. Клеточная пластичность дает основание для разработки нового направления коррекции гипергликемии при СД – индуцированной трансдифференциации не вырабатывающих инсулин клеток в инсулинсинтезирующие. Ряд авторов для подобного перепрограммиро-

вания использовали факторы транскрипции [4], микро РНК [5], костный морфогенетический белок [6], глюкагоноподобный пептид-1 [7]. В литературе есть данные о доставке факторов, вызывающих перепрограммирование клеток, с аденовирусом в качестве вектора [4, 5], описано перепрограммирование клеток *in vitro* с последующей трансплантацией полученных ИСК, что технически сложно осуществить. Более перспективным представляется перепрограммирование *in vivo* посредством стимулирования клеток, способных вырабатывать регуляторные факторы, такие, как нейрогенин [8], цитокины, факторы роста [1, 3]. Установлено, что фагоцитирующие мононуклеары, приобретающие фенотип М2 в результате действия аминофталгидразида, способны вырабатывать факторы роста [9], и в эксперименте действие этого иммуномодулятора усиливало восстановительный рост тканей вне зависимости от вида ткани и типа поражения [10, 11]. У крыс с аллоксановым диабетом модуляция активности моноцитов-макрофагов сопровождалась восстановлением количества β -клеток и снижением гипергликемии [12]. Известно, что кроме панкреатических инсулинсинтезирующих клеток (ВИСК), как одиночные, так и собранные в агломераты, не содержащие другие эндокриноциты [13]. Однако изменение количества ВИСК при сахарном диабете 1 и 2 типа исследовано недостаточно. Было показано, что количество ВИСК увеличивается у крыс с аллоксановым диабетом (модель СД 1 типа) при модуляции активности макрофагов [14]. Неясно, может ли модуляция активности макрофагов у животных с моделированием СД 2 типа способствовать увеличению количества внеостровковых инсулинцитов и усилению продукции инсулина этими клетками.

Цель работы — исследовать влияние модуляции активности макрофагов на количество внеостровковых инсулинсинтезирующих клеток и содержание в них инсулина при моделировании сахарного диабета 2 типа.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперименты на животных были одобрены Этическим Комитетом Института иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН (Екатеринбург, Россия) и выполнены в соответствии с принципами, сформулированными в Директиве 2010/63/EU Европейского парламента и Европейского Совета от 22 сентября 2010 года

о защите животных, используемых в научных целях (Официальный журнал Европейского союза, 2010 г.). Животные, используемые в исследовании, были помещены в карантин в виварии и на момент начала эксперимента были клинически здоровы. Все животные содержались в равных условиях (12 часов света /12 часов темноты), были помещены по 5 животных в клетку, их кормили в соответствии с обычным графиком со свободным доступом к воде.

Эксперименты проводилось на 20 половозрелых крысах-самцах линии Wistar, которые были поделены на 4 группы: одна оставлена в качестве интактной, остальным группам был введён никотинамид 110 мг/кг внутривентриально и через 15 минут — стрептозотоцин 65 мг/кг внутривентриально [15]. Вторая группа была выведена из эксперимента через 30 суток, третья — через 60 суток. Животным из четвёртой группы на 30-е сутки от начала эксперимента проводили курс инъекций модулятора активности макрофагов аминофталгидразида (АФГ) 2 мг/кг по схеме (20 инъекций).

В плазме крови крыс всех групп определяли содержание глюкозы глюкозоксидазным методом, в цельной крови — содержание гликированного гемоглобина методом аффинной гель-хроматографии с использованием стандартных наборов реактивов соответственно «Витал Диагностикс» (СПб) и «Диабет-тест» ФОСФОСОРБ (Москва), оптическую плотность определяли на спектрофотометре DU800 (Beckman Coulter Int S. A., Switzerland).

Поджелудочные железы животных всех групп после извлечения фиксировались в 10% забуференном формалине 24 часа с последующей заливкой в парафин. Срезы толщиной 2–3 мкм исследовались иммуногистохимически с использованием антител к инсулину (Anti-Rat Insulin/Proinsulin antibody; MA5–12042, ThermoScientific, Waltham). В ходе морфометрического исследования определялось количество, площадь и локализация (в ацинарной части поджелудочной железы или перидуктально) внеостровковых инсулин-синтезирующих клеток (ВИСК). Подсчитано количество ВИСК, расположенных одиночно, а также собранных в агломераты (от 2 до 5 клеток). Визуализация проводилась в программе Leica Application Suite V4.9. В программе Видео Тест Морфология 5.0 была определена оптическая плотность (ОП) инсулина в островках и ВИСК.

Данные представлены в виде среднее \pm ошибка среднего. Статистическая обработка результа-

тов эксперимента проводилась с применением программ MS Excel и OriginPro 9.0. Для сравнения двух независимых групп по количественному признаку использован непараметрический критерий Манна-Уитни (M-W). Различия между выборками считались статистически значимыми, если уровень значимости $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Через 30 суток после введения никотинамида и стрептозотоцина содержание глюкозы в плазме крови крыс достоверно увеличилось с $5,2 \pm 0,3$ ммоль/л до $12,1 \pm 0,7$ ммоль/л и оставалось повышенным ($13,7 \pm 2,7$ ммоль/л) к 60 суткам. В то же время достоверное накопление гликированного гемоглобина было отмечено только к 60 суткам стрептозотоцинового СД (с $4,7 \pm 0,2\%$ у интактных крыс до $6,6 \pm 0,5\%$ у крыс группы 3). После инъекций аминофталгидразида у крыс группы 4 уровень обоих пока-

зателей снизился относительно показателей нелеченных животных (соответственно глюкозы до $8,5 \pm 1,4$ ммоль/л и HbA1c до $4,8 \pm 0,6\%$).

При подсчете внеостровковых клеток было выявлено достоверное увеличение количества одиночных ацинарных ВИСК и количество ВИСК в протоковых агломератах на 30-е сутки стрептозотоцинового диабета по сравнению с теми же показателями интактных животных (таб. 1). К 60 суткам не наблюдалось увеличения ни одиночных, ни содержащихся в агломератах ВИСК. Напротив, отмечено уменьшение количества клеток в ацинарных агломератах относительно как показателя интактной группы, так и группы 2 со сроком СД 30 суток, а также уменьшение количества одиночных ацинарных клеток по сравнению с показателем группы 2 (таб. 1).

В группе диабетических крыс 4, получавших инъекции АФГ, наблюдалось достоверное возрастание количества одиночных протоко-

Таблица 1. Количество ВИСК разной локализации, клеток/мм² среза

Показатели	Группы			
	1 Интактные	2 СД 30 суток	3 СД 60 суток	4 СД+АФГ
ВИСК в ацинарных агломератах	$0,88 \pm 0,12$	$0,72 \pm 0,10$	$0,29 \pm 0,08^{*,**}$	$0,54 \pm 0,09^{***}$
ВИСК в протоковых агломератах	$0,18 \pm 0,01$	$0,36 \pm 0,03^*$	$0,26 \pm 0,09$	$0,38 \pm 0,12$
Одиночные ацинарные ВИСК	$0,20 \pm 0,04$	$0,71 \pm 0,12^*$	$0,36 \pm 0,07^{**}$	$0,32 \pm 0,08^{**}$
Одиночные протоковые ВИСК	$0,23 \pm 0,01$	$0,19 \pm 0,04$	$0,21 \pm 0,06$	$0,36 \pm 0,12^{***}$

Примечание: * – различие с показателем группы 1 достоверно при $P < 0,05$; ** – различие с показателем группы 2 достоверно при $P < 0,05$; *** – различие с показателем группы 3 достоверно при $P < 0,05$.

Таблица 2. Оптическая плотность инсулина в ВИСК разной локализации, относительные единицы оптической плотности

Оптическая плотность	Группы			
	1 Интактные	2 СД 30 суток	3 СД 60 суток	4 СД+АФГ
В ацинарных агломератах ВИСК	$0,450 \pm 0,010$	$0,429 \pm 0,020$	$0,360 \pm 0,020^{*,**}$	$0,546 \pm 0,030^{*,,*,***}$
В протоковых агломератах ВИСК	$0,440 \pm 0,020$	$0,440 \pm 0,060$	$0,440 \pm 0,030$	$0,580 \pm 0,020^{*,,*,***}$
В одиночных ацинарных ВИСК	$0,580 \pm 0,020$	$0,410 \pm 0,030^*$	$0,360 \pm 0,020^*$	$0,499 \pm 0,053^{***}$
В одиночных протоковых ВИСК	$0,440 \pm 0,040$	$0,388 \pm 0,020$	$0,350 \pm 0,050$	$0,690 \pm 0,070^{*,,*,***}$

Примечание: * – различие с показателем группы 1 достоверно при $P < 0,05$; ** – различие с показателем группы 2 достоверно при $P < 0,05$; *** – различие с показателем группы 3 достоверно при $P < 0,05$.

вых ВИСК и ВИСК в ацинарных агломератах по сравнению с аналогичными показателями нелеченных животных группы 3, и не было обнаружено снижения одиночных клеток и клеток в составе агломератов в протоковом и ацинарном отделах (таб. 1).

У животных со стрептозотоциновым диабетом не было обнаружено увеличения оптической плотности во всех группах внеостровковых клеток (таб. 2). В одиночных ацинарных ВИСК отмечено снижение данного показателя относительно оптической плотности интактной группы на 30-е сутки и дальнейшее снижение на 60-е сутки. Уменьшилась оптическая плотность также в ацинарных агломератах ВИСК на 60-е сутки. После действия АФГ выявлено восстановление нормального уровня оптической плотности в одиночных ацинарных ВИСК и возрастание оптической плотности инсулина, превышающее значение показателя интактной группы, в остальных группах внеостровковых клеток (таб. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Увеличение содержания глюкозы на 30-е и 60-е сутки эксперимента и накопление гликированного гемоглобина к 60 суткам подтверждает моделирование СД 2 типа, для которого не характерны резкие изменения диагностических показателей [15]. Возрастание количества одиночных ацинарных ВИСК и ВИСК в протоковых агломератах при развитии стрептозотоцинового диабета может быть следствием естественного процесса компенсации, развивающегося при разрушении островковых β -клеток [1, 2, 14]. Увеличенное количество ВИСК может появиться в результате описанного в литературе перепрограммирования различных типов клеток в инсулинсинтезирующие или их образования *de novo* [1]. В нашем эксперименте компенсаторное увеличение количества ВИСК выявлено только к 30 суткам с последующим их снижением к 60 суткам. Естественное компенсаторное увеличение количества ВИСК у диабетических крыс не сопровождалось более значительным содержанием инсулина, что может быть следствием незрелости клеток, подвергшихся спонтанному перепрограммированию в инсулинсинтезирующие [3]. В то же время модуляция макрофагов способствовала увеличению количества ВИСК и содержанию в них инсулина, подтвержденному возрастанием оптической плотности инсулина во всех исследованных группах ВИСК, что способствовало снижению гипергликемии.

Установленное в эксперименте действие иммуномодуляции макрофагов может быть сравнимо с действием факторов, использованных зарубежными исследователями для восстановления пула ИСК [4–7].

ВЫВОДЫ

Таким образом, в эксперименте со стрептозотоциновым диабетом у крыс выявлена ограниченная во времени естественная компенсация в виде увеличения количества ВИСК без усиления их функциональной активности. Модуляция макрофагальной активности сопровождается увеличением не только количества ВИСК, но также их функциональной активности.

Работа выполнена в рамках гос. задания ИИиФ УрО РАН. № гос. регистрации темы АААА-А18–118020590107–0

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Chera S., Herrera P.L. Regeneration of pancreatic insulin-producing cells by in situ adaptive cell conversion. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2016, 40, 1–10.
2. Thowfeequ S., Myatt E.J., Tosh D. Transdifferentiation in developmental biology, disease, and in therapy. *Dev Dyn.* 2007, 236, 3208–3217.
3. Ungefroren H., Fändrich F. The programmable cell of monocytic origin (PCMO): a potential adult stem/progenitor cell source for the generation of islet cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2010, 654, 667–82.
4. Yamada T., Cavelti-Weder C., Caballero F., Lysy P.A., Guo L. et al. Reprogramming mouse cells with a pancreatic duct phenotype to insulin-producing β -like cells. *Endocrinology.* 2015, 156(6), 2029–38.
5. Teichenne J., Morró M., Casellas A., Jimenez V., Tellez N. et al. Identification of miRNAs involved in reprogramming acinar cells into insulin producing cells. *PLoS One.* 2015, 10(12): e0145116.
6. Klein D., Alvarez-Cubela S., Lanzoni G., Vargas N., Prabakar K.R. et al. BMP-7 induces adult human pancreatic exocrine-to-endocrine conversion. *Diabetes.* 2015, 64(12), 4123–34.
7. Sasaki S., Miyatsuka T., Matsuoka T.A., Takahara M., Yamamoto Y. et al. Activation of GLP-1 and gastrin signalling induces *in vivo* reprogramming of pancreatic exocrine cells into beta cells in mice. *Diabetologia.* 2015, 58(11), 2582–91.
8. Lemper M., Leuckx G., Heremans Y., German M.S., Heimberg H. et al. Reprogramming of human pancreatic exocrine cells to β -like cells. *Cell Death Differ.* 2015, 22(7), 1117–1130.
9. Jukic T., Ihan A., Jukic D. Tetrahydrophthalazine derivative sodium nucleinate exert its anti-inflammatory effects through inhibition of oxidative burst in human monocytes. *Coll. Antropol.* 2012, 36, 409–412.
10. Данилова И. Г., Блинкова Н. Б., Гетте И. Ф., Пьянкова З. А., Белоусова А. В. и др. Влияние активации

- макрофагов на морфофункциональное состояние тучных клеток печени крыс с аллоксановым диабетом. Российский иммунологический журнал. 2016, 3, 244–246. [Danilova I. G., Blinkova N. B., Gette I. F., Pyankova Z. A., Belousova A. V. et al. Impact of macrophage activation on the mast cell morphofunctional state in liver of alloxanised diabetic rats. Russian Immunological Journal. 2016, 3, 244–246. Russian].
11. Danilova I. G., Sarapultsev P. A., Medvedeva S. U., Gette I. F., Bulavintseva T. S. et al. Morphological restructuring of myocardium during the early phase of experimental diabetes mellitus. Anat Rec (Hoboken). 2015, 298(2), 396–407.
 12. Danilova I. G., Bulavintseva T. S., Gette I. F., Medvedeva S. Y., Emelyanov V. V. et al. Partial recovery from alloxan-induced diabetes by sodium phthalhydrazide in rats. Biomed. Pharmacother. 2017, 95, 103–110.
 13. Bouwens L., Pipeleers D. G. Extra-islet beta cells associated with ductules are frequent in adult human pancreas. Diabetologia. 1998, 41, 452–459.
 14. Булавинцева Т. С. Роль макрофагов в процессе поддержания общей численности β -клеток поджелудочной железы при аллоксановом диабете. Симбиоз Россия 2011: материалы IV Всероссийского с международным участием конгресса студентов и аспирантов-биологов. Изд-во Воронежского государственного университета. Воронеж 2011, Т. 2, 8–10. [Bulavintseva T. S. The role of macrophages in the process of maintaining the total number of pancreatic β -cells in alloxan diabetes. Symbiosis Russia 2011: materials of the IV Russian with the international participation congress of students and postgraduate biologists. Publishing house of Voronezh State University. Voronezh 2011, V. 2, 8–10. Russian].
 15. Спасов А. А., Воронкова М. П., Сингур Г. Л., Чепляева Н. И., Чепурнова М. В. Экспериментальная модель сахарного диабета типа 2. Биомедицина. 2011, 3, 12–18. [Spasov A. A., Voronkova M. P., Singur G. L., Cheplyaeva N. I., Chepurnova M. V. Experimental model of type 2 diabetes mellitus. Biomedicine. 2011, 3, 12–18. Russian].

INFLUENCE OF MACROPHAGE MODULATION ON THE STATE OF EXTRA ISLET INSULIN-PRODUCING SYSTEM IN HYPERGYCEMIA

© 2018 K. V. Sokolova^{1,2}, A. V. Belousova¹, I. F. Gette^{1,2},
I. G. Danilova^{1,2}, M. T. Abidov²

¹*Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russia;*

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

Received: 09.05.2018. **Accepted:** 23.06.2018

Restoring of insulin-synthesizing cell pool by means of macrophage activity modulation can be a promising direction in the treatment of diabetes mellitus. Modeling of type 2 diabetes mellitus in rats (110 mg / kg of nicotinamide and 65 mg / kg of streptozotocin) caused a spontaneous compensatory increase in the number of extra islet insulin-producing cells up to 30 days, followed by a decrease in the number of these cells by 60 days without enhancing their functional activity. Modulation of macrophage activity with the administration of aminophthalhydrazide (2 mg / kg, 20 injections) to diabetic rats was accompanied by an increase in the number of the extra islet insulin-producing cells, the accumulation of insulin in all the studied groups of these cells, and a reduction in hyperglycemia.

Key words: macrophages, streptozotocin diabetes, extra islet insulin-producing cells

Authors:

Sokolova K. V., ✉ laboratory assistant researcher, Laboratory of Morphology and Biochemistry IIP UB RAS, Yekaterinburg, Russia; 620 049 Yekaterinburg, Pervomaiskaya str., 106, Institute of Immunology and Physiology. Phone: +7906 8007258, 8(343)3740070; **E-mail:** kssokolova@bk.ru;

Belousova A. V., junior researcher, Laboratory of Morphology and Biochemistry IIP UB RAS, Yekaterinburg, Russia;

Gette I. F., senior researcher, Laboratory of Morphology and Biochemistry IIP UB RAS, Yekaterinburg, Russia;

Danilova I. G., BD PhD, Assistant Professor, Head of the Laboratory of Morphology and Biochemistry IIP UB RAS, Yekaterinburg, Russia;

Abidov M. T., MD PhD, Professor, Chair of Medical Biochemistry and Biophysics, UrFU, Yekaterinburg, Russia.