

УДК 616.379-008.64-021.6:611.36/.37.018.1:612.349.8]-092.9

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-6-13>

## Инсулин-позитивные клетки печени и экзокринной части поджелудочной железы у животных с экспериментальным сахарным диабетом

Байкенова М.Б.<sup>1,2</sup>, Черешнев В.А.<sup>1</sup>, Соколова К.В.<sup>1,2</sup>, Гетте И.Ф.<sup>1</sup>, Емельянов В.В.<sup>2</sup>, Данилова И.Г.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук (ИИФ УрО РАН) Россия, 620049, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106

<sup>2</sup> Уральский федеральный университет (УФУ) имени первого Президента России Б.Н. Ельцина Россия, 620002, г. Екатеринбург, ул. Мира, 19

### РЕЗЮМЕ

**Цель исследования:** сопоставить количество инсулин-положительных (инсулин<sup>+</sup>) клеток печени и экзокринной части поджелудочной железы с концентрацией глюкозы и гликированного гемоглобина (HbA<sub>1c</sub>) в крови, а также с количеством Pdx1-положительных (Pdx1<sup>+</sup>) клеток в этих органах при различных типах сахарного диабета в эксперименте.

**Материалы и методы.** Эксперимент проводился на 25 самцах крыс (линия Вистар, масса (303,0 ± 25,3) г), которые были разделены на три группы: 1-я – интактные животные, 2-я – животные с экспериментальным сахарным диабетом 1-го типа, 3-я – животные с экспериментальным сахарным диабетом 2-го типа. В работе осуществляли биохимический, иммуноферментный, иммуногистохимический и статистический анализы.

**Результаты.** В печени и экзокринной части поджелудочной железы крыс с экспериментальным сахарным диабетом 1-го и 2-го типов обнаружены инсулин<sup>+</sup> и Pdx1<sup>+</sup>-клетки. Наибольшее количество инсулин<sup>+</sup>-клеток в печени отмечается при сахарном диабете 2-го типа. Установлена корреляция между количеством инсулин<sup>+</sup>-клеток в печени и концентрацией HbA<sub>1c</sub> в крови при сахарном диабете 1-го и 2-го типов.

**Заключение.** Инсулин<sup>+</sup>-клетки определяются в печени и экзокринной части поджелудочной железы интактных животных и крыс, у которых воспроизведена модель сахарного диабета 1-го и 2-го типов. Животные с экспериментальным сахарным диабетом 2-го типа характеризуются большим количеством инсулин<sup>+</sup>-клеток печени по сравнению с крысами с экспериментальным сахарным диабетом 1-го типа. В зависимости от типа сахарного диабета в печени меняется локализация инсулин<sup>+</sup>-клеток. При экспериментальном сахарном диабете 2-го типа инсулин<sup>+</sup>-клетки печени расположены во всех частях печеночной доли, тогда как у животных с экспериментальным сахарным диабетом 1-го типа эти клетки обнаруживаются преимущественно перипортально. Вероятно, экспрессия Pdx1<sup>+</sup> в ацинарных клетках поджелудочной железы и клетках печени представляет собой механизм их перепрограммирования в инсулин<sup>+</sup>-клетки при экспериментальном сахарном диабете.

**Ключевые слова:** сахарный диабет, поджелудочная железа, печень, инсулин<sup>+</sup>-клетки, Pdx1<sup>+</sup>-клетки.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Источник финансирования.** Работа выполнена при поддержке гранта РНФ (№ 16-1500039-П) и бюджетной темы ИИФ УрО РАН (№ АААА-А18-118020590108-7).

**Соответствие принципам этики.** Исследование одобрено этическим комитетом Института иммунологии и физиологии УрО РАН (протокол No-d-ТМ-2016-20).

✉ Байкенова Мадина Багатчановна, e-mail: m.b.baikenova@urfu.ru.

**Для цитирования:** Байкенова М.Б., Черешнев В.А., Соколова К.В., Гетте И.Ф., Емельянов В.В., Данилова И.Г. Инсулин-позитивные клетки печени и экзокринной части поджелудочной железы у животных с экспериментальным сахарным диабетом. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (4): 6–13. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-6-13>.

## Insulin-positive cells in liver and exocrine part of pancreas in animals with experimental diabetes mellitus

Baykenova M.B.<sup>1,2</sup>, Chereshnev V.A.<sup>1</sup>, Sokolova K.V.<sup>1,2</sup>, Gette I.F.<sup>1</sup>, Emelianov V.V.<sup>2</sup>, Danilova I.G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (UB RAS) 106, Pervomaiskaya Str., Yekaterinburg, 620219, Russian Federation

<sup>2</sup> Ural Federal University (UrFU) named after the first President of Russia B.N. Yeltsin 19, Mira Str., Yekaterinburg, 620002, Russian Federation

### ABSTRACT

**Aim.** To compare the number of insulin<sup>+</sup> cells in the liver and exocrine part of the pancreas with the type of experimental diabetes, blood glucose and glycated hemoglobin (HbA<sub>1c</sub>) level and with the number of Pdx1<sup>+</sup> cells.

**Materials and methods.** The experiment was carried out on 25 male Wistar rats (weighting (303.0 ± 25.3) g) that were divided into 3 groups: the first group consisted of intact animals, the second had animals with experimental diabetes type 1, and the third with animals with experimental diabetes type 2. Biochemical, immunohistochemical, ELISA methods and statistical analysis were used.

**Results.** Insulin<sup>+</sup> and Pdx1<sup>+</sup> cells of rats with experimental diabetes were found in the liver and exocrine part of pancreas. The highest number of insulin<sup>+</sup> cells in the liver was detected in type 2 diabetes (T2D). A strong positive correlation between the number of insulin<sup>+</sup> cells in the liver and level of glycosylated hemoglobin in the blood was revealed in both type 1 and type 2 diabetes.

**Conclusion.** Insulin<sup>+</sup> cells are detected in the liver and acinar part of pancreas of both intact rats and rats with experimental diabetes. Group with T2D is characterized by the highest number of insulin<sup>+</sup> cells in the liver compared with type 1 diabetes (T1D). The localization of insulin<sup>+</sup> cells in the liver changes depending on the type of diabetes. In T2D insulin<sup>+</sup> cells are located in all parts of liver acini, meanwhile in animals with T1D such cells are mainly detected in the periportal area. The expression of Pdx1<sup>+</sup> in acinar cells of pancreas and liver cells is likely a mechanism for their reprogramming into insulin<sup>+</sup> cells in experimental diabetes mellitus.

**Key words:** diabetes mellitus, pancreas, liver, insulin<sup>+</sup> cells, Pdx1<sup>+</sup> cells.

**Conflict of interest.** Authors declare no actual or potential conflict of interest related to publication of this article.

**Source of financing.** This work was financially supported by the Russian Science Foundation, grant No. 16-1500039-II and the budget project No. AAAA-A18-118020590108-7 of the Institute of Immunology and Physiology UB RAS.

**Conformity with the principles of ethics.** The study was approved by the local ethics committee under the Institute of Immunology and Physiology UB RAS (Protocol No-d-TM-2016-20).

**For citation:** Baykenova M.B., Chereshnev V.A., Sokolova K.V., Gette I.F., Emelianov V.V., Danilova I.G. Insulin-positive cells in liver and exocrine part of pancreas in animals with experimental diabetes mellitus. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (4): 6–13. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-6-13>.

## ВВЕДЕНИЕ

Актуальность изучения сахарного диабета (СД) обусловлена его широким распространением, инвалидизацией и высоким уровнем смертности пациентов. В настоящее время в мире сахарный диабет диагностирован у 422 млн человек [1]. Экспоненциальное увеличение числа пациентов с СД требует новых терапевтических стратегий для снижения социально-экономического бремени этого заболевания [2]. СД – хроническое эндокринное заболевание, которое характеризуется перманентной гипергликемией, возникающей на фоне абсолютной или относительной недостаточности инсулина. Сахарный диабет 1-го (СД1) и 2-го типа (СД2) характеризуется неспособностью эндокринных клеток ( $\beta$ -клеток) панкреатических островков удовлетворять потребность организма в инсулине из-за своей почти полной потери или функционального дефицита  $\beta$ -клеток в условиях инсулинорезистентности. Дефицит  $\beta$ -клеток (~ 90% при длительно существующем СД1, ~ 65% при длительно существующем СД2) считается следствием гибели  $\beta$ -клеток [3].

Синтез инсулина является специфическим для  $\beta$ -клеток панкреатических островков и жестко контролируется на уровне транскрипции. Фактор транскрипции Pdx1 определяет скорость транскрипции и стабильность м-РНК инсулина. Pdx1 является как фактором дифференцировки  $\beta$ -клеток во время эмбриогенеза, так и регулятором инсулин-продуцирующей функции клеток панкреатических островков в постнатальном периоде развития [4]. В процессе дифференцировки  $\beta$ -клеток экспрессия Pdx1 усиливается, а в экзокринных эпителиоцитах ацинусов и выводных протоков поджелудочной железы экспрессия данного гена, напротив, постепенно снижается. Предполагают, что в постнатальном периоде экспрессия Pdx1 сохраняется у здоровых животных только в  $\beta$ -клетках [5]. Однако в настоящее время инсулин-положительные (инсулин<sup>+</sup>) клетки были обнаружены в экзокринной части поджелудочной железы, головном и костном мозге, селезенке, печени и жировой ткани животных [6, 7].

Паренхима печени и поджелудочная железа в онтогенезе имеют энтодермальное происхождение. Есть предположение, что оба органа включают единые плюрипотентные стволовые клетки, способные дифференцироваться как в гепатоциты, так и в  $\beta$ -клетки поджелудочной железы. Более того, гепатоциты и  $\beta$ -клетки поджелудочной железы экспрессируют большую группу специфических транскрипционных факторов, а также используют однотипную систему транспорта глюкозы в клетку (GLUT2) и

включают ее в метаболизм путем фосфорилирования глюкокиназой [8].

На основании вышеизложенного цель нашего исследования – сопоставить количество инсулин<sup>+</sup>-клеток печени и экзокринной части поджелудочной железы с концентрацией глюкозы и гликированного гемоглобина (HbA<sub>1c</sub>) в крови, а также с количеством Pdx1<sup>+</sup>-клеток в этих органах при различных типах сахарного диабета в эксперименте.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент выполнен на 25 самцах крыс линии Вистар массой (303,0 ± 25,3) г, которые были распределены на три группы: 1-я – интактные животные ( $n = 10$ ), 2-я – животные с экспериментальным сахарным диабетом 1-го типа ( $n = 8$ ), 3-я – животные с экспериментальным сахарным диабетом 2-го типа ( $n = 7$ ). Моделирование СД1 производилось внутрибрюшинным введением аллоксана, разведенного в 0,85%-м растворе хлорида натрия, в суммарной дозе 170 мг/кг массы тела животного по модифицированной авторской методике [9]. СД2 моделировали внутрибрюшинным введением стрептозотоцина, разведенного в цитратном буфере, в дозе 65 мг/кг массы тела животного, с предварительным (за 15 мин) внутрибрюшинным введением водного раствора никотиламида в дозе 110 мг/кг массы тела животного [10]. Животных выводили из эксперимента на 30-е сут передозировкой эфирного наркоза. Предварительно у крыс брали кровь из хвостовой вены. После проведения срединной лапаротомии у животных извлекали поджелудочную железу и печень. Фрагменты этих органов фиксировали в 10%-м водном растворе нейтрального формалина 24 ч. После промывки (8 ч) фрагменты органов подвергали стандартной гистологической проводке в автоматизированном тканевом процессоре Leica TP 1020 (Leica Microsystems, Германия) с последующей заливкой материала в парафин в системе Leica EG 1160 (Leica Microsystems, Германия). Срезы толщиной 3–4 мкм изготавливали на микротоме Leica SM 2000R (Leica Microsystems, Германия).

Для верификации формирования модели СД в крови животных определяли концентрацию глюкозы, HbA<sub>1c</sub> и инсулина. Концентрацию глюкозы и HbA<sub>1c</sub> определяли с использованием стандартных наборов (Вектор Бест, Россия; Гликогемтест, Россия), инсулина – иммуноферментным методом с использованием набора Rat/Mouse Insulin ELISA (Millipore, США) и иммуноферментного автоматического анализатора LAZURITE (Dy nex Technologies, США).

Иммуногистохимическое исследование поджелудочной железы и печени проводили с ис-

пользованием антител к инсулину и проинсулину (cloneINS04+INS05, Invitrogen, США) и антител к Pdx1<sup>+</sup> (Abcam, США) по стандартным протоколам производителей антител. Первичные антитела использовали в рабочем разведении 1 : 200 и инкубировали при 4 °С в течение 16 ч. Выявление инсулина велось с использованием авидин-биотин-пероксидазного комплекса, Pdx1<sup>+</sup> – с помощью козьего иммуноглобулина (Ig) G (H + L) к антигенам мыши, конъюгированные с флуоресцентным красителем (Thermo Fisher, США). Для проверки протокола и исключения неспецифического окрашивания проводили постановку негативного и позитивного контроля. Позитивным контролем для иммуногистохимического выявления инсулина и Pdx1<sup>+</sup> являлись срезы поджелудочной железы интактных крыс [11, 12]. Негативный контроль окрашивания производили на аналогичных срезах поджелудочной железы по соответствующим протоколам, исключая первичные антитела [12, 13].

Подсчет инсулин<sup>+</sup>-клеток проводили на световом микроскопе Leica DM 2500 (Leica, Германия), анализ изображений выполняли в программе «Видео Тест-Морфология 5.0» (Видеотест, Россия), подсчет Pdx1<sup>+</sup>-клеток осуществляли на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе LSM 710 (Carl Zeiss, Германия) с использованием программы ZEN 2.0 (Carl Zeiss, Германия).

В экзокринной части поджелудочной железы подсчитывали количество инсулин<sup>+</sup>-клеток и Pdx1<sup>+</sup>-клеток в 1 мм<sup>2</sup> среза органа, в печени – количество инсулин<sup>+</sup>- и Pdx1<sup>+</sup>-клеток в печеночных пластинках во всех зонах печеночной долики, в синусоидных капиллярах – общее количество синусоидальных клеток на протяжении всей печеночной долики, а также общее количество инсулин<sup>+</sup>-синусоидальных клеток, расположенных во всех частях печеночной долики в 1 мм<sup>2</sup> среза печени. Функциональную активность инсулин<sup>+</sup>-клеток оценивали по оптической плотности их цитоплазмы.

Статистическую обработку проводили с помощью программ Statistica 6.0 (DELL, США), OriginPro 9.0 (Origin Lab, США) и Microsoft Excel 2003 (Microsoft, США). Для проверки гипотезы об однородности двух независимых выборок применялся непараметрический *U*-критерий Манна – Уитни, а также критерий Краскела – Уоллиса. При проверке статистических гипотез использовался уровень значимости 5% ( $p < 0,05$ ). Данные представлены в виде среднего и ошибки среднего ( $M \pm m$ ). Для выявления взаимосвязи числа инсулин<sup>+</sup>-клеток, Pdx1<sup>+</sup>-клеток и концентрации глюкозы, HbA<sub>1c</sub> в крови рассчитывали коэффициент парной линейной корреляции (*r*) Пирсона.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Концентрация глюкозы и HbA<sub>1c</sub> в крови крыс при экспериментальном СД1 и СД2 по сравнению с аналогичными показателями интактных животных увеличена, тогда как концентрация инсулина в плазме крови крыс снижена только при СД1. При СД2 концентрация инсулина в плазме крови крыс выше аналогичного показателя животных группы СД1, что характерно для СД2 (табл. 1).

Таблица 1

Концентрация глюкозы, HbA <sub>1c</sub> и инсулина в крови крыс во всех группах, $M \pm m$			
Показатель	Группа 1 (интактные животные)	Группа 2 (животные с СД1)	Группа 3 (животные с СД2)
Глюкоза, ммоль/л	5,00 ± 0,30	10,88 ± 0,46*	10,90 ± 0,50*
HbA <sub>1c</sub> , %	4,40 ± 0,30	6,73 ± 0,78*	6,58 ± 0,97*
Инсулин, мкг/л	1,28 ± 0,19	0,50 ± 0,09*	1,00 ± 0,13 #

\* различие по сравнению с показателем контроля ( $p < 0,05$ ); # различие по сравнению с показателем группы СД1 ( $p < 0,05$ ) (здесь и в табл. 2–4).

Имуногистохимический анализ показал наличие инсулин<sup>+</sup>- и Pdx1<sup>+</sup>-клеток в экзокринной части поджелудочной железы и печени во всех зонах печеночной долики экспериментальных животных (рис.).

Количество инсулин<sup>+</sup>- и Pdx1<sup>+</sup>-клеток в экзокринной части поджелудочной железы при СД1 и СД2 не отличается от их содержания у интактных животных. Количество инсулин<sup>+</sup>-клеток в печени у животных с СД1 и СД2 выше, чем у интактных животных. При СД1 инсулин<sup>+</sup>-клетки в печени локализованы преимущественно в периферической зоне печеночной долики, при СД2 данные клетки встречаются во всех зонах печеночной долики. Подсчет общего количества инсулин<sup>+</sup>- и Pdx1<sup>+</sup>-клеток осуществлялся на всем протяжении печеночной долики. Также отдельно приведены данные количества инсулин<sup>+</sup>-клеток в периферической зоне печеночной долики. Количество Pdx1<sup>+</sup>-клеток в печени крыс с экспериментальным СД увеличено по сравнению с интактными животными. Данный показатель у крыс группы СД1 выше аналогичного показателя интактных животных (табл. 2).

Оптическая плотность цитоплазмы инсулин<sup>+</sup>-клеток в печени и поджелудочной железе при СД1 меньше, чем у интактных животных. У животных с экспериментальным СД1, в отличие от крыс с экспериментальным СД2, возрастает продукция инсулина в инсулин<sup>+</sup>-синусоидальных клетках, поскольку величина оптической плотности цитоплазмы этих клеток выше по сравнению с аналогичными показателями у интактных животных и крыс с экспериментальным СД2 (табл. 3).

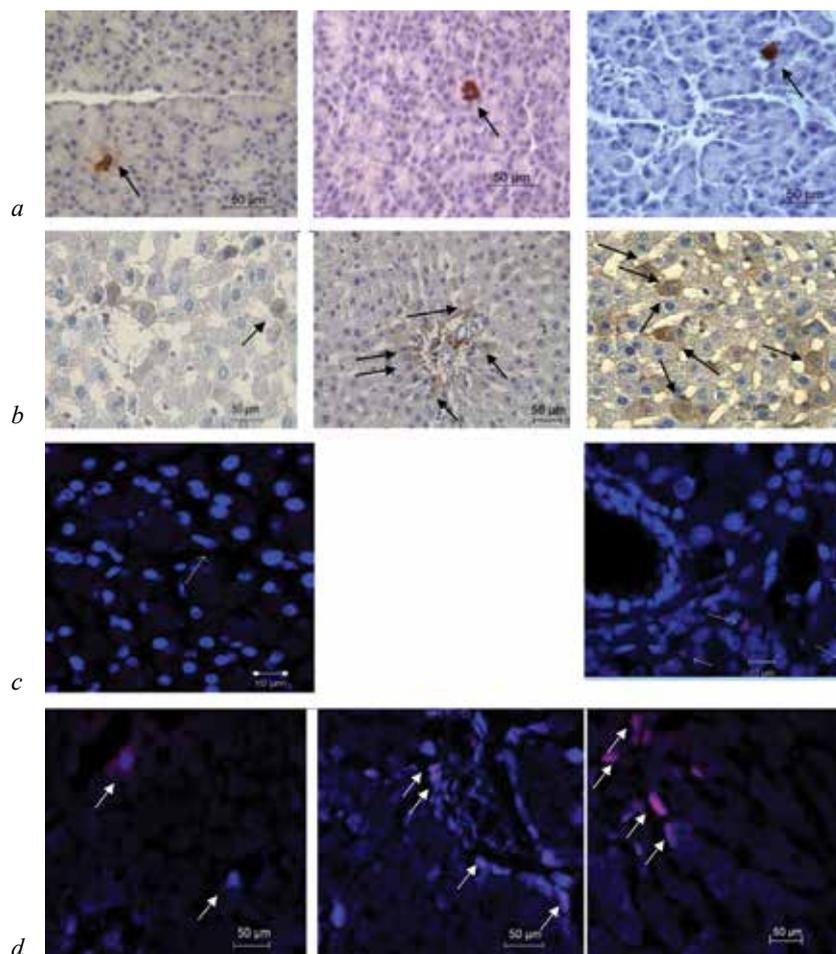


Рисунок. Поджелудочная железа (a, c) и печень (b, d) intactных животных, животных с СД1 и СД2; иммуногистохимическое окрашивание на инсулин (a, b) и иммунофлуоресцентное окрашивание на Pdx1<sup>+</sup> (c, d): стрелками показаны инсулин<sup>+</sup>- и Pdx1<sup>+</sup>-клетки, ×400

Таблица 2

Количество инсулин <sup>+</sup> - и Pdx1 <sup>+</sup> -клеток в печени и экзокринной части поджелудочной железы крыс, шт./мм <sup>2</sup> среза органа, M ± m			
Показатель	Группа 1 (intактные животные)	Группа 2 (животные с СД1)	Группа 3 (животные с СД2)
Количество инсулин <sup>+</sup> -клеток в экзокринной части поджелудочной железы	3,50 ± 0,54	3,67 ± 0,73	3,15 ± 0,34
Количество Pdx1 <sup>+</sup> -клеток в экзокринной части поджелудочной железы	27,34 ± 4,92	–	21,54 ± 3,22
Количество инсулин <sup>+</sup> -клеток в печеночных пластинках печени	14,26 ± 0,84	24,86 ± 2,36*	151,50 ± 7,34*#
Количество инсулин <sup>+</sup> -клеток в печеночных пластинках в периферической зоне	0	13,58 ± 3,08*	41,10 ± 4,93*#
Количество Pdx1 <sup>+</sup> -клеток в печени	32,11 ± 2,14	42,72 ± 1,59*	34,09 ± 2,46

Таблица 3

Оптическая плотность (ОП) цитоплазмы инсулин <sup>+</sup> -клеток в печени и экзокринной части поджелудочной железы крыс, усл. ед., M ± m			
Показатель	Группа 1 (intактные животные)	Группа 2 (животные с СД1)	Группа 3 (животные с СД2)
ОП цитоплазмы инсулин <sup>+</sup> -клеток в экзокринной части поджелудочной железы	0,44 ± 0,02	0,37 ± 0,02*	0,42 ± 0,02
ОП цитоплазмы инсулин <sup>+</sup> -клеток в печеночных пластинках	0,20 ± 0,01	0,17 ± 0,012*	0,19 ± 0,01
ОП цитоплазмы инсулин <sup>+</sup> -синусоидальных клеток	0,29 ± 0,24	0,35 ± 0,01*	0,30 ± 0,01#

Число инсулин<sup>+</sup>-синусоидальных клеток увеличено при разных типах СД по сравнению с аналогичным показателем у интактных животных. Наибольшее

значение этот показатель достигает у крыс с экспериментальным СД2, при этом локализованы данные клетки во всех зонах печеночной долилки (табл. 4).

Таблица 4

Количество синусоидальных и инсулин <sup>+</sup> -синусоидальных клеток в печени крыс, шт./мм <sup>2</sup> среза печени, $M \pm m$			
Показатель	Группа 1 (интактные животные)	Группа 2 (животные с СД1)	Группа 3 (животные с СД2)
Общее количество синусоидальных клеток	387,11 ± 14,19	645,22 ± 33,95*	713,15 ± 33,47*#
Общее количество инсулин <sup>+</sup> -синусоидальных клеток	13,82 ± 0,63	19,19 ± 0,89*	37,80 ± 3,39*#
Количество инсулин <sup>+</sup> -синусоидальных клеток в периферической зоне печеночной долилки	0,63 ± 0,03 (4,6 ± 0,02%)	5,64 ± 0,32* (29,7 ± 2,80%)*	17,91 ± 2,71*# (48,1 ± 7,70%)*#

Для определения связи между количеством инсулин<sup>+</sup>- и Pdx1<sup>+</sup>-клеток печени с концентрацией глюкозы в крови крыс использовался коэффициент парной линейной корреляции. Полученные результаты демонстрируют сильную положительную корреляцию между количеством инсулин<sup>+</sup>-клеток печени и концентрацией HbA<sub>1c</sub> в крови, что свидетельствует о гипергликемии в течение месяца как при СД1, так и при СД2. В то же время имеется слабая положительная корреляция между количеством инсулин<sup>+</sup>-клеток печени и концентрацией глюкозы в крови крыс, измеренной на 30-е сут, при СД1 и положительная корреляция средней силы – при СД2. Установлено, что между количеством инсулин<sup>+</sup>- и Pdx1<sup>+</sup>-клеток печени имеется слабая обратная корреляция (табл. 5). Так, при СД1 количество инсулин<sup>+</sup>-клеток печени меньше, чем при СД2, однако количество Pdx1<sup>+</sup>-клеток увеличено по сравнению с СД2. Взаимосвязь между концентрацией HbA<sub>1c</sub> и количеством Pdx1<sup>+</sup>-клеток при СД1 и СД2 слабо выражена. Коэффициент парной линейной корреляции между концентрацией глюкозы и количеством Pdx1<sup>+</sup>-клеток при СД1 – относительно высокий, при этом СД2 характеризуется более низкой взаимосвязью этих параметров.

Таблица 5

Коэффициент парной линейной корреляции между количеством инсулин <sup>+</sup> -клеток и Pdx1 <sup>+</sup> -клеток и концентрацией глюкозы и HbA <sub>1c</sub> в крови, а также между количеством инсулин <sup>+</sup> - и Pdx1 <sup>+</sup> -клеток в печени у крыс			
Тип клеток	Глюкоза	HbA <sub>1c</sub>	Pdx1 <sup>+</sup> клетки
Инсулин <sup>+</sup> -клетки печени при СД1	0,13	0,84	-0,49
Инсулин <sup>+</sup> -клетки печени при СД2	0,58	0,98	-0,25
Pdx1 <sup>+</sup> -клетки печени при СД1	0,84	0,47	–
Pdx1 <sup>+</sup> -клетки печени при СД2	0,26	0,41	–

## ОБСУЖДЕНИЕ

Недостаточное количество и дисфункция инсулин-продуцирующих β-клеток панкреатических островков являются основной причиной гипергликемии и связанных с ней осложнений, возникающих

при СД1 и СД2 [14]. Поиск методов, направленных на увеличение количества и повышение функциональной активности сохранившихся β-клеток при СД, является перспективной стратегией для лечения обоих типов диабета. Инсулин<sup>+</sup>-клетки, обнаруженные в различных органах, привлекают все большее внимание исследователей, поскольку могут частично компенсировать повреждение β-клеток панкреатических островков при СД [15]. В работе были изучены количество и локализация инсулин<sup>+</sup>-клеток в печени и экзокринной части поджелудочной железы в зависимости от типа экспериментального СД.

Инсулин<sup>+</sup>-клетки обнаруживаются в паренхиме печени и поджелудочной железы (вне панкреатических островков) в небольшом количестве у интактных животных. В поджелудочной железе крыс количество этих клеток остается постоянным при СД1 и СД2. Оптическая плотность цитоплазмы этих клеток также не отличается в условиях моделирования СД1 и СД2.

Увеличение количества инсулин<sup>+</sup>-клеток у крыс с экспериментальной моделью СД1 и СД2 выявляется только в печени. Существуют различия не только в количестве инсулин<sup>+</sup>-клеток в зависимости от типа диабета (при СД2 типа их число почти в 5 раз больше, чем в печени животных с СД1), но и в локализации этих клеток. При СД2 инсулин<sup>+</sup>-клетки расположены во всех частях печеночной долилки, тогда как у животных группы СД1 эти клетки обнаруживаются преимущественно в периферической зоне. По структуре, размерам и расположению инсулин<sup>+</sup>-клетки в печени соответствуют гепатоцитам.

Синусоидальные клетки печени (СКП) расположены вдоль печеночных синусоидов и составляют около 33% клеток паренхимы печени. К СКП относят эндотелиальные клетки, звездчатые макрофаги (клетки Купфера) [16], перисинусоидальные липоциты (клетки Ито), pit-клетки и дендритные клетки. СКП обладают способностью к фагоцитозу и пиноцитозу и участвуют в широком спектре иммунологических реакций [17].

При анализе количества СКП было установлено, что их число увеличивается при обоих типах СД, но в большей степени при СД2. Нами обнаружено, что при СД2 количество инсулин<sup>+</sup>-синусоидальных клеток больше, чем при СД1. Подсчет количества инсулин<sup>+</sup>-синусоидальных клеток в периферической зоне печеночной дольки необходим для сравнения данного показателя с количеством инсулин<sup>+</sup>-клеток в печеночных пластинках (предположительно гепатоциты), расположенных в аналогичной зоне. Имеются данные [6], что инсулин<sup>+</sup>-гепатоциты локализуются преимущественно в первой (периферической) зоне печеночной дольки. В связи с этим количество инсулин<sup>+</sup>-синусоидальных клеток, расположенных в промежуточной (второй) зоне, не указано. Инсулин<sup>+</sup>-гепатоциты характеризуются в целом более низкой оптической плотностью цитоплазмы по сравнению с  $\beta$ -клетками поджелудочной железы, что свидетельствует об относительно небольшом содержании инсулина в этих клетках и отражает их низкую функциональную активность. Увеличение количества клеток данного типа может быть как результатом синтеза инсулина в самих клетках, так и их способности к эндоцитозу внеклеточного инсулина [18].

Панкреатический и дуоденальный белок Pdx1 является ключевым фактором в развитии, пролиферации и функционировании  $\beta$ -клеток панкреатических островков [19]. Он способен связываться с промотором гена инсулина, GLUT-2, глюкокиназой и другими, регулируя экспрессию генов этих белков [20]. Считается, что Pdx1 может перепрограммировать любые клетки, стимулируя в них синтез инсулина [21]. Мы наблюдали различия в изменении количества Pdx1<sup>+</sup>-клеток печени на экспериментальных моделях СД: при СД1 их количество значительно увеличивается, при СД2 их количество не изменяется. Коэффициент парной линейной корреляции свидетельствует о сильной связи числа Pdx1<sup>+</sup>-клеток печени с концентрацией HbA<sub>1c</sub> в крови, отражающего выраженность гипергликемии в течение эксперимента. Вероятно, при моделировании СД1 инсулин-продуцирующие клетки печени не компенсируют недостаток инсулина, поэтому требуется дополнительная продукция Pdx1. Напротив, у животных с СД2 нормализация концентрации инсулина в крови не требует дальнейшего перепрограммирования гепатоцитов в инсулин-продуцирующие клетки. Также нельзя исключить, что причиной выявленных различий между животными с СД1 и СД2 может быть участие в дифференцировке инсулин-продуцирующих клеток других транскрипционных факторов, в частности Nkx 6.1 [5]. Полученные результаты позволяют выдвинуть гипотезу о существовании обратной связи

между концентрацией инсулина в крови и продукцией Pdx1 в гепатоцитах как механизма компенсации гипoinsулинемии при СД.

Таким образом, при экспериментальном СД1 и СД2 недостаток инсулина может быть восполнен увеличением количества клеток, продуцирующих инсулин, в печени и экзокринной части поджелудочной железы. В качестве механизма получения большего количества инсулин-продуцирующих клеток может рассматриваться перепрограммирование дифференцированных клеток, таких как гепатоциты, в инсулин<sup>+</sup>-клетки. Новые подходы в лечении СД, направленные на увеличение экспрессии Pdx1 и количества инсулин<sup>+</sup>-клеток в различных органах, представляются чрезвычайно перспективными.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые показано, что при экспериментальном СД1 и СД2 в печени крыс увеличивается количество инсулин<sup>+</sup>- и Pdx1<sup>+</sup>-клеток. У животных с экспериментальным СД1 инсулин<sup>+</sup>-клетки печени обнаруживаются преимущественно в периферической зоне печеночной дольки. При экспериментальном СД2 инсулин<sup>+</sup>-клетки расположены во всех частях печеночной дольки, а количество Pdx1<sup>+</sup>-клеток не отличается от такового у интактных животных. Выявлена сильная положительная корреляция количества инсулин<sup>+</sup>-клеток печени от концентрации HbA<sub>1c</sub> в крови как при СД1, так и при СД2. Корреляция между количеством инсулин<sup>+</sup>-клеток печени и концентрацией глюкозы в крови крыс на 30-е сут эксперимента положительная, слабая при СД1 и средняя при СД2.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Harris-Hayes M., Schootman M., Schootman J.C., Hastings M.K. The Role of physical therapists in fighting the type 2 diabetes epidemic. *J. Orthop. Sports. Phys. Ther.* 2020; 50 (1): 5–16.
2. Salinno C., Cota P., Bastidas-Ponce A., Tarquis-Medina M., Lickert H, Bakhti M.  $\beta$ -Cell maturation and identity in health and disease. *International Journal of Molecular Sciences.* 2019; 20 (21): 5417–5422.
3. Moin A.S.M., Butler A.E. Alterations in betacell identity in type 1 and type 2 diabetes. *Current Diabetes Reports.* 2019; 19 (9): 83. DOI: 10.1007/s11892-019-1194-6.
4. Hui H., Perfetti R. Pancreas duodenum homeobox-1 regulates pancreas development during embryogenesis and islet cell function in adulthood. *European Journal of Endocrinology.* 2002; 146 (2): 129–141. DOI: 10.1530/eje.0.1460129.
5. Oster A., Jensen J., Serup P., Galante P., Madsen O.D., Larsson L.I. Rat endocrine pancreatic development in relation to two homeobox gene products (Pdx-1 and Nkx 6.1). *Histochem. Cytochem.* 1998; 46 (6): 707–715.
6. Kojima H., Fujimiya M., Matsumura K., Nakahara T., Hara M., Chan L. Extrapancratic insulin producing cells in multiple

- organs in diabetes. *PNAS*. 2004; 101 (8): 2458–2463. DOI: 10.1073/pnas.0308690100.
7. Beamish C.A., Strutt B.J., Arany E.J., Hill D.J. Insulin-positive, Glut2-low cells present within mouse pancreas exhibit lineage plasticity and are enriched within extra-islet endocrine cell clusters. *Islets*. 2016; 8 (3): 65–82. DOI: 10.1080/19382014.2016.1162367.
  8. Dong-Sik H., Juyoung S., Ji-Won K., Heon-Seok P., Jae-Hyung C., Kun-Ho Y. Generation of functional insulin-producing cells from neonatal porcine liver-derived cells by PDX1/VP16, BETA2/NeuroD and MafA. *PLoS One*. 2013; 8 (11): 76–79.
  9. Данилова И.Г., Гетте И.Ф. Способ моделирования аллоксанового диабета. Патент на изобретение № 2534411; 2014.
  10. 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.
  11. Hewitt S.M., Baskin D.G., Frevert C.W., Stahl W.L., Rosa-Molinar E. Controls for immunohistochemistry: the Histochemical Society's standards of practice for validation of immunohistochemical assays. *J. Histochem. Cytochem.* 2014; 62 (10): 693–697. DOI: 10.1369/0022155414545224.
  12. Seeberger K.L., Anderson S.J., Ellis C.E., Yeung T.Y., Korbutt G.S. Identification and differentiation of PDX1  $\beta$ -cell progenitors within the human pancreatic epithelium. *World J. Diabetes*. 2014; 5 (1): 59–68. DOI: 10.4239/wjd.v5.i1.59.
  13. Иммуногистохимические методы: руководство; пер. с англ. под ред. Г.А. Франка, П. Г. Малькова. М., 2011: 224.
  14. Geerts A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin. Liver Dis.* 2001; 21: 311–335.
  15. Kojima H., Fujimiya M., Terashima T., Kimura H., Chan L. Extraprostatic proinsulin/insulin-expressing cells in diabetes mellitus: Is history repeating itself? *Endocr. J.* 2006; 53 (6): 715–722.
  16. Okada T., Kimura A., Kanki K., Nakatani S., Nagahara Y., Hiraga M. et al. Liver Resident macrophages (Kupffer cells) share several functional antigens in common with endothelial cells. *Scandinavian Journal of Immunology Experimental Immunology*. 2016; 83: 139–150.
  17. Банин В.В., Белоусова Т.А., Быков В.Л. и др. Terminologia histologica. Международные термины по цитологии и гистологии человека с официальным списком русских эквивалентов: справочное пособие; под ред. В.В. Банина, В.Л. Быкова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009: 272.
  18. Vekemans K., Braet F. Structural and functional aspects of the liver and liver sinusoidal cells in relation to colon carcinoma metastasis. *World J. Gastroenterol.* 2005; 1 (33): 5095–5102. DOI: 10.3748/wjg.v11.i33.5095.
  19. Chakrabarti S.K., James J.C., Mirmira R.G. Quantitative assessment of gene targeting in vitro and in vivo by the pancreatic transcription factor, PDX1. Importance of chromatin structure in directing promoter binding. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 13286–13293.
  20. Andrali S., Smapley M, Vanderford N., Ozcan S. Glucose regulation of insulin gene expression in pancreatic  $\beta$ -cells. *Biochemical Journal*. 2008; 415 (1): 1–10.
  21. Koblas T., Leontovyc I., Loukotova S., Kosinova L., Saudek F. Reprogramming of pancreatic exocrine cells AR42J into insulin-producing cells using mRNAs for PDX1, Ngn3, and MafA transcription Factors. *Official Journal of the American Society of Gene & Cell Therapy*. 2016; 5: 1–12.

## Вклад авторов

Байкенова М.Б., Соколова К.В. – работа с экспериментальными животными, выполнение лабораторной части исследования, статистическая обработка результатов исследования. Черешнев В.А. – обоснование рукописи и проверка критически важного интеллектуального содержания. Гетте И.Ф. – разработка концепции и дизайна исследования, постановка эксперимента, моделирование СД. Емельянов В.В., Данилова И.Г. – анализ и интерпретация данных, подготовка текста статьи.

## Сведения об авторах

**Байкенова Мадина Багатчановна**, мл. науч. сотрудник, ИИФ УрО РАН; аспирант, УФУ им. первого Президента России Б.Н. Ельцина, г. Екатеринбург. ORCID 0000-0001-5697-0370.

**Черешнев Валерий Александрович**, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, гл. науч. сотрудник, ИИФ УрО РАН, г. Екатеринбург. ORCID 0000-0002-5777-8097.

**Соколова Ксения Викторовна**, мл. науч. сотрудник, ИИФ УрО РАН; аспирант, УФУ им. первого Президента России Б.Н. Ельцина, г. Екатеринбург. ORCID 0000-0002-7024-4110.

**Гетте Ирина Федоровна**, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, ИИФ УрО РАН, г. Екатеринбург. ORCID 0000-0003-3012-850X.

**Емельянов Виктор Владимирович**, канд. мед. наук, доцент, кафедра иммунохимии, кафедра медицинской биохимии и биологии, УФУ им. первого Президента России Б.Н. Ельцина, г. Екатеринбург.

**Данилова Ирина Георгиевна**, д-р биол. наук, доцент, зав. лабораторией морфологии и биохимии, ИИФ УрО РАН, г. Екатеринбург. ORCID 0000-0001-6841-1197.

(✉) **Байкенова Мадина Багатчановна**, e-mail: m.b.baikeno@urfu.ru.

Поступила в редакцию 18.02.2020

Подписана в печать 29.09.2020