Институт иммунологии и физиологии

Уральского отделения Российской академии наук

УДК 591.169.2

Белоусова Анна Викторовна

Влияние макрофагов на регенерацию островкового аппарата поджелудочной железы в условиях экспериментального сахарного диабета 2 типа

Специальность 14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология

Научные руководители:

Данилова И.Г., д.б.н.

Черешнев В.А. профессор, д.м.н.

Екатеринбург – 2018

# Оглавление

[Оглавление 2](#_Toc517045706)

[Введение 7](#_Toc517045707)

[Глава 1. Общая характеристика системы фагоцитирующих мононуклеаров 10](#_Toc517045708)

[1.2 Активация и фенотипы макрофагов 11](#_Toc517045709)

[1.3 Цитокины, секретируемые макрофагами 16](#_Toc517045710)

[1.3.1 Провоспалительные цитокины 16](#_Toc517045711)

[1.3.2 Противовоспалительные цитокины 19](#_Toc517045712)

[1.3.3 Хемокины 21](#_Toc517045713)

[1.4 Сигнальные пути, участвующие в активации макрофагов 21](#_Toc517045714)

[Глава 2. Сахарный диабет второго типа и роль макрофагов в его развитии 25](#_Toc517045715)

[Глава 3. Участие макрофагов в регенерации поджелудочной железы 35](#_Toc517045716)

[3.1 Особенности развития поджелудочной железы 35](#_Toc517045717)

[3.2 Участие макрофагов в развитии и функционировании поджелудочной железы 36](#_Toc517045718)

[3.3 Особенности регенерации поджелудочной железы 39](#_Toc517045719)

[3.4 Участие макрофагов в регенерации поджелудочной железы. 41](#_Toc517045720)

[Глава 4. Методические вопросы исследования 43](#_Toc517045721)

[4.1 Общая характеристика лабораторных животных 43](#_Toc517045722)

[4.2 Моделирование сахарного диабета 2 типа 43](#_Toc517045723)

[4.3 Модуляция макрофагальной активности 46](#_Toc517045724)

[4.4 Исследование биохимических показателей крови 47](#_Toc517045725)

[4.5 Гематологические исследования 48](#_Toc517045726)

[4.6 Гистологический метод анализа срезов поджелудочной железы 49](#_Toc517045727)

[4.7 Иммуногистохимические и иммунофлюоресцентные методы анализа 50](#_Toc517045728)

[4.7.1 Оценка изменений в инсулинпродуцирующем аппарате поджелудочной железы. 50](#_Toc517045729)

[4.7.2 Оценка пролиферативной активности инсулинсинтезирующих клеток. 51](#_Toc517045730)

[4.7.3 Оценка апоптотической активности инсулинсинтезирующих клеток 52](#_Toc517045731)

[4.7.4 Количественная оценка содержания макрофагов фенотипа F4/80 в поджелудочной железе 53](#_Toc517045732)

[4.7.5 Количественная оценка содержания макрофагов фенотипа М2 в поджелудочной железе 54](#_Toc517045733)

[4.8 Морфометрические методы анализа 55](#_Toc517045734)

[4.8.1 Анализ морфологического строения поджелудочной железы 55](#_Toc517045735)

[4.8.2 Анализ содержания β-клеток и инсулина в островках поджелудочной железы 56](#_Toc517045736)

[4.8.3 Анализ пролиферативной и апоптотической активности β-клеток. 56](#_Toc517045737)

[4.8.4 Анализ содержания F4/80+ и СD163+ клеток 56](#_Toc517045738)

[4.9 Иммуноферментные методы анализа 56](#_Toc517045739)

[4.9.1 Определение гормонов 56](#_Toc517045740)

[4.9.2 Оценка цитокинового профиля поджелудочной железы 57](#_Toc517045741)

[4.10 Статистические методы 57](#_Toc517045742)

[Глава 5. Изучение регенерации островков Лангерганса при развитии сахарного диабета 2 типа 59](#_Toc517045743)

[5.1 Оценка регенераторных показателей островков Лангерганса интактной и контрольной группах животных 59](#_Toc517045744)

[5.2 Регенерация островков Лангерганса при развитии сахарного диабета 2 типа. 60](#_Toc517045745)

[5.3 Изменение биохимических показателей крови при развитии сахарного диабета 2 типа 64](#_Toc517045746)

[5.4 Изменение гематологических показателей крови при развитии сахарного диабета 2 типа 68](#_Toc517045747)

[5.5 Заключение к разделу 69](#_Toc517045748)

[Глава 6. Оценка регенераторных показателей островков Лангерганса при модуляции функциональной активности макрофагов 70](#_Toc517045749)

[6.1 Оценка структуры островков Лангерганса при модуляции функциональной активности макрофагов здоровых животных. 70](#_Toc517045750)

[6.1.1 Оценка функциональной активности β-клеток при модуляции макрофагов 71](#_Toc517045751)

[6.1.2 Оценка пролиферации β-клеток при модуляции функциональной активности макрофагов 72](#_Toc517045752)

[6.2 Изменение биохимических показателей крови при модуляции функциональной активности макрофагов 72](#_Toc517045753)

[6.2.1 Исследование функциональных показателей поджелудочной железы 72](#_Toc517045754)

[6.2.2 Исследование функциональных показателей печени 73](#_Toc517045755)

[6.2.3 Исследование функциональных показателей почек 73](#_Toc517045756)

[6.3 Изменение гематологических показателей крови при модуляции функциональной активности макрофагов 74](#_Toc517045757)

[6.4 Заключение к разделу 76](#_Toc517045758)

[6.5 Оценка регенераторных показателей островков Лангерганса при модуляции функциональной активности макрофагов на фоне развития сахарного диабета 2 типа 77](#_Toc517045759)

[6.5.1 Оценка функциональной активности β-клеток при модуляции активности макрофагов на фоне развития сахарного диабета 2 типа 78](#_Toc517045760)

[6.5.2 Оценка пролиферации β-клеток при модуляции функциональной активности макрофагов на фоне развития сахарного диабета 2 типа 81](#_Toc517045761)

[6.6 Изменение биохимических показателей крови при модуляции функциональной активности макрофагов на фоне развития сахарного диабета 2 типа 82](#_Toc517045762)

[6.6.1 Исследование функциональных показателей поджелудочной железы 83](#_Toc517045763)

[6.6.2 Исследование функциональных показателей печени 83](#_Toc517045764)

[6.6.3 Исследование функциональных показателей почек 84](#_Toc517045765)

[6.7 Изменение гематологических показателей крови при модуляции функциональной активности макрофагов на фоне развития сахарного диабета 2 типа 85](#_Toc517045766)

[6.8 Заключение к разделу 88](#_Toc517045767)

[Глава 7. Изучение функциональной активности макрофагов и оценка их количества в поджелудочной железе 89](#_Toc517045768)

[7.1 Оценка количества макрофагов в норме и при развитии сахарного диабета 2 типа 90](#_Toc517045769)

[7.2 Оценка фенотипа макрофагов в поджелудочной железе в норме и при развитии сахарного диабета 2 типа 90](#_Toc517045770)

[7.2.1 Изучение поверхностных маркеров макрофагов в норме и при развитии сахарного диабета 2 типа 91](#_Toc517045771)

[7.2.2 Изучение цитокинового профиля макрофагов в норме и при развитии сахарного диабета 2 типа 91](#_Toc517045772)

[7.3 Оценка количества макрофагов при модуляции их функциональной активности в норме и на фоне развития сахарного диабета 2 типа 92](#_Toc517045773)

[7.4 Оценка фенотипа макрофагов в поджелудочной железе при модуляции их функциональной активности в норме и на фоне развития сахарного диабета 2 типа 92](#_Toc517045774)

[7.4.1 Изучение поверхностных маркеров макрофагов при модуляции их функциональной активности в норме и на фоне развития сахарного диабета 2 типа 92](#_Toc517045775)

[7.4.2 Изучение цитокинового профиля макрофагов при модуляции их функциональной активности в норме и на фоне развития сахарного диабета 2 типа 93](#_Toc517045776)

[Заключение 94](#_Toc517045777)

[Выводы 96](#_Toc517045778)

[Список сокращений 98](#_Toc517045779)

[Список литературы 100](#_Toc517045780)

# Введение

**Актуальность проблемы**. Сахарный диабет 2 типа является одним из социально значимых заболеваний: на сегодняшний день по данным ВОЗ около 400 миллионов человек на планете имеют такой диагноз. Диабет 2 типа оказывает существенное негативное влияние на качество жизни, приводит к инвалидности и смерти. Затраты, связанные со своевременным диагностированием, предотвращением и лечением этого заболевания оказывают существенное давление на систему здравоохранения всех развитых стран.

За последние десятилетия медицина и фармакология продвинулись в поддержании качества жизни больных диабетом: доступно большое количество фармакологических препаратов, позволяющих контролируемо снижать уровень глюкозы в крови; разработаны специализированные диеты и рекомендации по образу жизни, нивелирующие пагубное влияние диабета второго типа на организм. Однако полноценное лечение заболевания - устранение механизмов возникновения патологии, до сих пор является важнейшей задачей для клинической медицины и фармакологии.

Сахарный диабет 2 типа характеризуется мультифакториальной наследственной предрасположенностью, инсулинорезистентностью и относительной инсулиновой недостаточностью вследствие разрушения β-клеток панкреатических островков. Соответственно, одним из перспективных направлений терапии является восстановление инсулин-продуцирующих клеток. В настоящее время разрабатываются методы лечения, основанные на генетической терапии с использованием CRISPR-CAS систем, но, несмотря на всю перспективность этого направления, подобные методы были и остаются дорогостоящими для клинической практики. Поэтому для лечения сахарного диабета 2 типа особую значимость имеет разработка более доступных методов терапии.

Известно, что макрофаги с фенотипом М2 способствуют регенерации поджелудочной железы. В отличие от макрофагов типа М1, которые активируются при воспалении и увеличивают выработку цитокинов ИЛ-1β, ИЛ-12, TNF-α, ИЛ-6, макрофаги типа М2 секретируют цитокины TGF-β, ИЛ-10 и т.д, которые способствуют регенерации тканей [15, 47, 48].

Восстановление β-клеток под воздействием резидентных макрофагов организма, стимулируемых различными химическими веществами, например, описанными в литературе препаратами на основе аминофталагидрозидов [110], являющихся эффективными антиоксидантами и, кроме этого, модулирующими макрофагальную активность представляется перспективным направлением терапии сахарного диабета 2 типа [111].

**Целью** данной работы является изучение влияния макрофагов на регенерацию островкового аппарата поджелудочной железы при развитии экспериментального диабета 2 типа.

**Задачи исследования**

1. Оценить структурные повреждения панкреатических островков поджелудочной железы в динамике развития сахарного диабета 2 типа.
2. Провести оценку количества макрофагов, их функциональной активности и фенотипа в поджелудочной железе в динамике развития сахарного диабета 2 типа.
3. Изучить возможность коррекции повреждений островков Лангерганса при развитии сахарного диабета 2 типа путем модуляции функциональной активности макрофагов.
4. Сравнить морфофункциональные характеристики панкреатических островков в зависимости от функциональной активности макрофагов в динамике развитии сахарного диабета 2 типа.

**Научная новизна работы.** Впервые показано, что функциональная активность макрофагов определяет стратегию регенераторных процессов островков Лангерганса. Установлено, что макрофаги уменьшают повреждение островкового аппарата поджелудочной железы.

Впервые показано, что макрофаги способствуют пролиферации бета-клеток и стимулируют их функциональную активность, что приводит к увеличению уровня инсулина и уменьшению гипергликемии.

Впервые показано, что характер и выраженность регенераторных процессов островкового аппарата зависит от фенотипа и функций макрофагов поджелудочной железы.

**Теоретическая значимость работы.** Результаты исследования носят фундаментальный характер и расширяют представления о макрофагальной регуляции восстановления поджелудочной железы при сахарном диабете 2 типа. Полученные данныесвидетельствуют о макрофагальной стратегии регуляции регенераторных процессов островкового аппарата поджелудочной железы в динамике развития сахарного диабета 2 типа.

Во-первых, макрофаги предотвращают повреждение островков Лангерганса, во-вторых, усиливают пролиферацию β-клеток и количественное содержание их в панкреатическом островке. В-третьих, повышают функциональную активность β-клеток, что приводит к увеличению концентрации инсулина и уменьшению уровня глюкозы в плазме крови.

Продемонстрировано, что макрофаг-зависимая регуляция регенераторных процессов определяется фенотипом макрофагов.

**Практическая значимость работы.** Результаты исследования могут найти применение при создании новых методов и подходов к терапии сахарного диабета 2 типа путем целенаправленного изменения функционального состояния фагоцитирующих мононуклеаров с помощью иммуномодулирующих лекарственных препаратов.

# Глава 1. Общая характеристика системы фагоцитирующих мононуклеаров

К системе фагоцитирующих мононуклеаров относятся кроветворные клетки-предшественники моноцитов-макрофагов костного мозга, циркулирующие в крови моноциты и тканеспецифические макрофаги. Моноциты и тканевые макрофаги являются основными клетками системы врожденного иммунитета, обеспечивающими немедленную реакцию на проникновение в организм чужеродного патогенного агента, а также участвуют в запуске реакций системы приобретенного иммунитета. В здоровом организме макрофаги отвечают за поддержание гомеостаза ткани, они устраняют апоптотические клетки и перерабатывают тканевые метаболиты в питательные вещества, а также за своевременный ответ на вторжение патогенных агентов, повреждение или трансформацию клеток ткани. Нарушение функций макрофагов приводит к развитию хронических воспалений, аутоиммунных заболеваний, а также может являться фактором развития злокачественных опухолей [1]][2][3][4][5][6].

Считается, что моноциты крови не являются однородной популяцией. Они отличаются хемокиновыми рецепторами, экспрессией молекул адгезии, поверхностными маркерами, которые определяют ответ на стимулы и степень миграции в ткани, от чего зависит их участие в воспалении или в регуляции тканевого гомеостаза.

У человека было выделено три популяции в зависимости от экспрессии молекул CD14 и CD16 на поверхности клеток. Эти популяции имеют разнообразные функции, в том числе поступают в ткани и дифференцируются либо в провоспалительные макрофаги, либо в противовоспалительные. У мышей выделяют популяцию моноцитов Ly6C+, которые дифференцируются в провоспалительные макрофагии и Ly6C-, которые дифференцируются в противовоспалительные макрофаги [7][8].

Таким образом, циркулирующие в крови моноциты могут присоединятся к эндотелию сосудов (пристеночный пул моноцитов) и мигрировать в ткани, дифференцируясь в них в тканевые макрофаги. Эти моноциты имеют высокий уровень экспрессии воспалительных хемокиновых рецепторов ССR2 низкий уровень хемокиновых рецепторов CX3CR1 и являются основным источником воспалительных макрофагов в тканях. Моноциты, которые имеют высокий уровень экспрессии рецепторов CX3CR1 и низкий уровень ССR2 рецепторов, являются предшественниками резидентных тканевых макрофагов [3][6].

Жизненный цикл макрофагов завершается апоптозом. Погибают они в легких, селезенке и лимфоузлах [1].

## 1.2 Активация и фенотипы макрофагов

Состояние макрофагов и форма их активности определяются внешними воздействиями, для восприятия которых существует огромное количество рецепторов, разделяющихся на несколько групп: рецепторы для Fc-фрагментов иммуноглобулинов (FcR), рецепторы для бактериальных липополисахаридов, паттерн-распознающие рецепторы (PRR), рецепторы для компонентов комплемента, рецепторы к нейромедиаторам, рецепторы к гормонам (инсулину, глюкокортикоидам, глюкагону, минералокортикоидам, эстрогену), рецепторы к эйкозаноидам, рецепторы к цитокинам, рецепторы к ростовым факторам [1][6][10].

Различные стимулы, обусловленные сигналами от вышеперечисленных рецепторов, активируют макрофаги и определяют их фенотип. Ранее выделяли две группы макрофагов - классически активированные, провоспалительные (М1 фенотип) и альтернативно активированные противовоспалительные (М2 фенотип) макрофаги, различающиеся клеточными маркерами, секрецией цитокинов и других биологически активных веществ, экспрессией основного комплекса гистосовместимости класса II (МНСII). Классификация макрофагов M1/M2 теперь считается упрощенным подходом, который не в полной мере описывает все более расширяющийся спектр популяций макрофагов. Например, идентификация макрофагов, связанных с опухолью, не соответствует классификации М1/М2 [11]. Кроме того, были идентифицированы макрофаги, экспрессирующие Т-клеточные рецепторы (TCR) и CD169 [12].

Макрофаги М1 фенотипа отвечают за воспалительные процессы, а макрофаги М2 фенотипа за регенерацию тканей и защиту от паразитарной инвазии. Переход от одного фенотипа к другому называется поляризацией макрофагов. Так, в поляризации М1 макрофагов участвуют IFN-γ, TNF-α, IL-1β, GM-CSF, IL-12, IL-18, IL-23 [13][14][9][10]. Повышение микробицидной активности происходит за счет активации индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) для получения NO из L-аргинина[16][14] а также усиливается продукция провоспалительных цитокинов, таких как TNF-α, IL-1β, IL-12, IL-18, IL-23 [9][10][14][15], которые способствуют дифференцировке Th1 и Th17 лимфоцитов и секреции ими цитокинов [17][10][18][15][1]. Фенотипически макрофаги M1 экспрессируют высокие уровни MHCII, маркера CD68 и ко-стимулирующих молекул CD80 и CD86[15]. В [19] было также показано, что макрофаги M1 экспрессируют ингибитор генов М2-цитокинов SOCS3.

Активация макрофагов M2 индуцируется грибковыми клетками, иммунными комплексами, гельминтами, компонентами комплемента, апоптозными клетками, макрофагальным колониестимулирующим фактором, IL-4, IL-13, IL-10 и TGF-β[13][14][9][10][15]. Эта активация приводит к секреции высоких количеств IL-10 и низких уровней IL-12. Фенотипически макрофаги M2 были охарактеризованы как IL-12lowIL-10highIL-1decoyRhigh, IL-1RAhigh. Кроме того, они экспрессируют высокие уровни рецепторов маннозы и галактозы Е-типа и С-типа. М2 макрофаги не являются однородной популяцией, их делят на М2а, М2b, M2c и M2d [14].

Основными цитокинами, активирующими М2а фенотип макрофагов являются IL-4 и IL-13, а также грибковые и гельминтовые инфекции [20]. Повышается синтез противовоспалительных цитокинов, в частности IL-10, а синтез провоспалительных цитокинов и оксида азота снижается. Одной из характерных черт этого типа макрофагов является изменение в метаболизме аргинина за счет усиленного синтеза аргиназы 1, расщепляющей L-аргинин до L-орнитина и мочевины. Это способствует снижению синтеза оксида азота, для которого необходим L-аргинин. Кроме того, L-орнитин может превращаться в пролин, необходимый для синтеза коллагена и восстановления межклеточного матрикса или в полиамины, стимулирующие пролиферацию клеток [14][21][1]. Также эти макрофаги синтезируют большое количество фибронектина. Таким образом, макрофаги фенотипа М2а могут способствовать регенерации тканей. Еще одной функцией макрофагов этого типа является защита от паразитов. Хитин способствует инфильтрации тканей базофилами и эозинофилами, вырабатывающими IL-4, что вызывает поляризацию макрофагов в М2а фенотип и выработку ими хитинолитических ферментов и хитин-связывающих белков [14]. Эти вещества (YMI и YM2) также вовлечены в ремоделирование тканей. Пролонгированная активация макрофагов этого типа может привести к фиброзу, что связано с пролонгированной стимуляцией аргиназы 1 [1].

M2b макрофаги активируются лигандами рецептора IL-1, иммунными комплексами и LPS. M2c активируются IL-10, TGF-β и глюкокортикоидами [20][14].

Макрофаги типа М2b и М2с не участвуют в восстановлении тканей и характеризуются низкой активностью аргиназы 1. Фенотип М2b – это резидентные макрофаги тканей. Оба типа макрофагов могут презентировать антигены Т-клеткам, вызывая Th2 – ответ и, следовательно, повышенную секрецию IL-4, вызывая усиление гуморального иммунного ответа [1]. Однако, по данным [22] макрофаги М2с фенотипа способствуют восстановлению тканей, помимо противовоспалительной функции.

Четвертый тип, M2d, активируется IL-6 и аденозином. M2d-макрофаги имеют фенотипические и функциональные признаки, сходные с опухолеассоциированными макрофагами яичников и отличаются от M2a, b, c [14][20].

M1 и M2 макрофаги имеют различные хемокиновые профили, при этом M1, секретируют хемокины CXCL9 и CXCL10 привлекающие Th1, а M2, секретируют CCL17, CCL22 и CCL24 [23]. В [24] было показано, что изменение поляризации происходит быстро и включает в себя переключение сигнальных сетей как на транскрипционном, так и на трансляционном уровнях.

Таблица 1. Фенотипические различия макрофагов

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| M1 | М2а | М2b | М2с | М2d |
| Cтимулы для поляризации макрофагов | | | | |
| GM-CSF  LPS  TNF-α  IFN-γ | IL-4  IL-13  Грибковые и гельминтные инфекции | Иммунные комплексы  IL-1R | IL-10  TGF-β  глюкокортикоиды | IL-6  аденозин |
| Экспрессируемые маркеры | | | | |
| CD86  CD80  CD68  MHC II  IL-1R  TLR2  TLR4  iNOS  SOCS3  CD38  Gpr18  Fpr2 | CD163  MHC II  SR  MMR/CD206  CD200R  TGM2  DecoyR  IL-1R II  *Ym1/2*  *Fizz1*  *Arg-1* | CD86  MHC II | CD163  TLR1  TLR8 | VEGF |
| Секреция цитокинов | | | | |
| TNF-α  IL-1 β  IL-6  IL-12  IL-23 | IL-10  TGF- β  IL-1Ra  Фибронектин  IGF | IL-1  IL-6  IL-10  TNF-α | IL-10  TGF-β  Mer tyrosine kinase | IL-10  IL-12  TNF-α  TGF-β |
| Секреция хемокинов | | | | |
| CXCL8(IL-8)  CXCL9(MIG)  CXCL10(IP-10)  CХCL11(ITAC)  CCL5 (RANTES)  CCL8 (MCP-2)  CCL9(MIP-1γ)  CCL2 (MCP-1)  CCL3 (MIP-1α)  CCL4 (MIP-1β) | CCL17 (TARC)  CCL22(MDC)  CCL24 (MPIF-2, Eotaxin-2) | CCL1(TCA-3) | CCR2 | CCL5  CXCL10  CXCL16 |

[14][20][23][6][25][26]

## 1.3 Цитокины, секретируемые макрофагами

Активированные макрофаги продуцируют цитокины, которые являются полипептидами или белками, часто гликозилированными, большинство из них имеют молекулярную массу от 5 до 10 кДа. На тканевом уровне цитокины ответственны за развитие воспаления и последующую регенерацию тканей [27][2][28].

#### 1.3.1 Провоспалительные цитокины

IL-1 является индуцибельным белком, синтез которого начинается в ответ на внедрение микроорганизмов либо повреждение тканей и необходим для развития местного воспаления и осуществления всего комплекса защитных реакций, именуемых острофазным ответом. Практически все струтктурные компоненты микроорганизмов индуцируют экспрессию гена и синтез IL-1 посредством взаимодействия с группой Толл-подобных рецепторов. У человека IL-1β является главной формой секреторного IL-1, IL-1α является мембранной формой и главным образом медиатором местных защитных реакций, очень незначительно секретируясь в окружающую среду, а IL-1β представляет собой секреторный цитокин, осуществляющий свое действие как местно, так и на системном уровне. У мышей, напротив, стимулированные макрофаги продуцируют главным образом IL-1α и гораздо меньшие количества 1L-1β, т.е. у мышей главной формой секретируемого клетками IL-1 служит IL-1α [27]. IL-1 является хемоаттрактантом для гранулоцитов, увеличивает экспрессию молекул клеточной адгезии на лейкоцитах и эндотелиальных клетках. В тучных клетках IL-1 индуцирует высвобождение гистамина, которое, в свою очередь, вызывает вазодилатацию и местное воспаление [2]. IL-1 способен вызывать продукцию провоспалительных цитокинов и самого себя, а также стимулирует дифференцировку Th17 лимфоцитов [29]. IL-1 стимулирует пролиферацию фибробластов и увеличивает продукцию ими простогландинов, ростовых факторов и ряда цитокинов, включая колониестимулирующие фактoры, интерлейкины и интерферон. Под влиянием IL-1 клетки соединительной ткани увеличивают синтез одновременно коллагена и коллагеназы, а также других ферментов, включая нейтральные протеазы и металлопротеиназы, таким образом, IL-1 способствует заживлению ран [27][29][28].

IL-18 является членом семейства IL-1. Он активирует в макрофагах индукцию ферментов циклооксигеназы и NO-синтазы, что способствует увеличению синтеза простогландинов и оксида азота. IL-18 в комбинации с IL-12 способствует выработке INF-γ Т-лимфоцитами и NK-клетками [27][29]. В отличие от IL-1, IL-18 не является пирогеном и может даже ослаблять индуцированную IL-1 лихорадку, что может являться следствием в некотором различии сигнальных путей этих цитокинов (IL-18 использует MAPK p38 – путь, а IL-1 NF-κB) [30,31]. Также он стимулирует дифференцировку Th1-лимфоцитов и ингибирует дифференцировку Th2 [28][29].

IL-6 является индуцибельным цитокином, активирует синтез большинства острофазных белков печени, тогда как IL-1 и TNF-α стимулируют лишь синтез отдельных белков и могут действовать опосредованно через IL-6. Также этот цитокин отвечает за производство нейтрофилов в костном мозге, поддерживает рост В-клеток и стимулирует дифференцировку Th17 лимфоцитов. В моноцитах и макрофагах IL-6 создает провоспалительный ответ за счет влияния на синтез хемокинов, привлекающих лейкоциты в зону воспаления. В мышцах он является противовоспалительным цитокином [27][28][29][32][33].

IL-12 стимулирует синтез IFN-γ NK-клетками и TNF-α Т-лимфоцитами, участвует в дифференцировке Th1 и ингибурует дифференцировку Th2- лимфоцитов [27][28][29][34][35]. IL-12 также может ингибировать ангиогенез через IFN-γ-опосредованную регуляцию антиангиогенного хемокина CXCL10[2].

IL-23 принадлежит к семейству интерлейкина 12. Он участвует в дифференцировке Тh17-лимфоцитов, стимулирует продукцию IFN-γ NK-клетками и презентацию антигенов дендритными клетками [2,27,36]. Согласно [29] IL-23 способствует воспалению благодаря активации металлопротеиназы матрикса 9 и ангиогенезу, уменьшает инфильтрацию CD8+ цитотоксическихT-лимфоцитов.

TNF-α (фактор некроза опухоли) участвует в системном воспалении, инициирует острофазную реакцию, является эндогенным пирогеном, участвует в апоптозе клеток, способствует некрозу опухолей [37]. Существует два вида рецепторов, с которыми может связываться TNF-α. Один находится на клетках большинства тканей организма, а другой только на клетках иммунной системы [38]. Ответ клетки на стимуляцию TNF- α будет зависеть от сигнального пути, который выбирается в зависимости от типа клетки, дополнительной стимуляции другими цитокинами, микроокружения и др. Сигнал может быть направлен по воспалительному, пролиферативному, апоптотическому или антиапоптотическому путям. Таким образом, кроме его основных воспалительной и апоптотической функции возможны и прямо противоположные [27][28].

#### 1.3.2 Противовоспалительные цитокины

IL-10 является антагонистом IL-12, участвует в пролиферации тучных клеток, дифференцировке B-клеток [28]. Ингибирует синтез макрофагами провоспалительных цитокинов, таких, как TNF-α, IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 и GM-CSF [39] и реактивных интермедиатов кислорода и азота. Способен предотвращать дифференцировку моноцитов крови в тканевые макрофаги и дендритные клетки [27]. IL-10 подавляет экспрессию MHCII, костимулирующих молекул CD80 и CD86 в активированных макрофагах и является, таким образом, мощным ингибитором представления антигена, способствует дифференцировке Th2-лимфоцитов [29][40]. IL-10 усиливает продукцию антивоспалительных цитокинов, таких, как IL-RA и растворимая форма рецептора TNF. Однако, IL-10 нельзя считать полностью антивоспалительным цитокином, так как он активирует NK-клетки, способствуя увеличению их цитотоксичности. У трансгенных мышей с избирательной экспрессией гена IL-10 в островках Лангрганса поджелудочной железы наблюдалось активное привлечение различных типов лейкоцитов в ткань железы, выраженная локальная асептическая реакция, напоминающая симптомы панкреатита, но без повреждения и подавления функциональной активности клеток островков и без развития диабета. Вероятно, одна из функций IL-10 может заключаться в усилении миграции лейкоцитов без их активации и повреждения ткани [27].

IL-1Ra является антагонистом рецептора IL-1 и в норме присутствует в плазме переферической крови в достаточно высоких концентрациях. По-видимому, присутствие IL-1Ra защищает организм от резкого увеличения уровня IL-1 в плазме в результате развития воспалительных процессов в тканях, которые в той или иной степени периодически возникают при попадании в организм патогенов [2][27].

TGF-β (трансформирующий фактор роста-β) имеет 5 изоформ, из них TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3 синтезируется клетками млекопитающих. TGF-β1 синтезируется практически всеми клетками в неактивной форме и сохраняется во внеклеточном матриксе после выхода из клетки, образуя депо цитокина, способного перейти в активную форму после воздействия свободных форм кислорода, ионизирующей радиации, изменении ph в кислую сторону при воспалении [27,41][42]. Во взрослом организме TGF-β способствует изменению пролиферации клеток, в большинстве случаев – подавлению, усилению формирования внеклеточного матрикса за счет активации синтеза его компонентов [27]. TGF-β подавляет дифференцировку Тh17 - лимфоцитов, а также пролиферацию T- и B-лимфоцитов [43][44]. Что касается макрофагов, TGF-β1 способствует их активации по противовоспалительному пути. Однако, в условиях хронического воспаления в присутствии большого количества провоспалительных цитокинов сигнал от TGF-β1 теряется и репрограммирования макрофагов не происходит [45].

IGF-1 (инсулиноподобный фактор роста-1) его рецепторы, как и рецепторы инсулина, экспрессируются повсеместно и опосредуют рост и метаболические эффекты гормонов практически во всех тканях у млекопитающих.

VEGF-эндотелиальный фактор роста. Участвует в ангиогенезе, ренгенерации тканей, эмбриональном развитии[17].

#### 1.3.3 Хемокины

Хемокины представляют собой большую группу цитокинов, которые регулируют движение клеток в организме и рассматриваются как долгодействующие медиаторы рекрутирования лейкоцитов. Хемокины различаются положением остатков цистеина и делятся на 4 группы: СХС, СС, С, СХ3С. Моноциты экспрессируют СХС и СС-хемокины. Первые активны в отношении нейтрофилов и Т-лимфоцитов, а вторые – в отношении моноцитов, базофилов, эозинофилов, которые имеют соответствующие рецепторы [26]. В тканях хемокины обычно иммобилизованы на экстрацеллюлярном матриксе или клеточной поверхности.

## 1.4 Сигнальные пути, участвующие в активации макрофагов

Активация макрофагов регулируется несколькими сигнальными путями, вызванными стимуляцией рецептора и внутриклеточными регуляторными белками.

JNK-зависимый сигнальный путь обеспечивает реакцию макрофагов на факторы роста, цитокины, жирные кислоты и лиганды рецепторов, сопряженных с G-белками. Этот путь вовлечен в репрограммирование макрофагов на М1 фенотип, в то же время содержит ответвление на SMAD3, что может ограничивать избыточную продукцию провоспалительных цитокинов.

PI3K/Akt-сигнальный путь обеспечивает реакцию макрофагов на цитокины и лиганды TLR, способствует репрограммированию макрофагов на М1 фенотип благодаря активациии Akt2 (увеличивает экспрессию генов М1 фенотипа, таких, как iNOSи TNF-α). Akt-1, напротив, способствует увеличению экспрессии генов M2 фенотипа, таких, как Arg-1 и IL-10. Помимо этого, ЛПС может увеличивать продукцию противовоспалительных медиаторов. Такой фенотип называ ют «switch». Возможность переключения сигнала между Akt1 и Akt2 в switch фенотипе является одним из механизмов высокой пластичности макрофагов.

Notch-зависимый сигнальный путь репрограммирует М1 фенотип макрофагов. В ответ на ЛПС на поверхностии макрофагов увеличивается количество DLL (delta-like) рецепторов, которые связываются с Notch-рецепторами, что ведет к его протеолизу и к образованию комплекса NICD, который активирует в ядре факторы транскрипции М1 фенотипа макрофагов, такие, как IL-12 и iNOS, а также увеличивается экспрессия ингибитора фактора транскрипции М2 генов SOCS3. Увеличению DLL рецепторов способствует сигнальный путь TLR4/NF-kB, запускаемый с LPS.

При патологиях Notch-зависимый сигнальный путь может привести к формированию М2 фенотипа. В этом случае трансляция сигнала осуществляется через PI3K и MAP-киназные пути и транслокацию NF-Kbp50 в ядро.

JAK/STAT-сигнальный путь передает сигналы с цитокиновых рецепторов на янус- киназы (тирозиновые рецепторы) и через них на факторы транскрипции STAT. Этот путь может транслировать в ядро сигналы как от IFN-γ и через STAT1 репрограммировать макрофаги на М1 фенотип, так и от IL-4, IL10, IL-13 и через STAT 3 и 6 репрограммировать макрофаги на М2 фенотип. Это позволяет макрофагу интегрировать репрограммирующий эффект микроокружения с разными цитокинами. Благодаря наличию М1 и М2-репрограммирующих путей, запускающихся с рецепторов IL-13, может формироваться switch -фенотип, который при угнетении М2-репрограммирующих путей будет увеличивать продукцию М1-цитокинов в ответ на сигналы от рецептора IL-13.

TLR/NF-kB – сигнальный путь обеспечивает М1 репрограммирование макрофагов в ответ на лиганды TLR. Благодаря возможности формирования NF-kB в разной форме, p65/p50 –провоспалительной и р50/р50 – противовоспалительной [46]. Например, этот путь использует IL-1 и через общий с TLR TIR-домен рецептора IL-1R1 активирует киназу IRAK, которая через инициирование последующего каскада реакций высвобождает NF-Bp65/p50. Он мигрирует в ядро и запускает гены, ответственные за развитие восполительной реакции. Освобождение NF-kB с некоторыми особенностями происходит также при сигнализации с рецептора TNFR1. TLR-зависимый путь может программировать switch фенотип, который будет в ответ на М1-сигналы увеличивать продукцию М2 цитокинов.

Гипоксия-индуцированный сигнальный путь. Когда макрофаги привлекаются к местам воспаления, они оказываются в состоянии гипоксии, которое может непосредственно влиять на их поляризацию. Существует две изоформы гипоксически-индуцируемого фактора (HIF), HIF-1α и HIF-2α.HIF-1α индуцирует продукцию макрофагами провоспалительных цитокинов TNFα, IL-1β, MIF, CCL3 и COX2 (циклооксигеназа 2), а HIF-2α способствует продукции M2 цитокинов IL-10 и аргиназы 1[46][10].

Существует усиление ответа макрофагов на фактор, с помощью которого репрограммируется макрофаг (прямое усиление) или на другой фактор (перекрестное усиление). Оно происходит за счет конвергенции сигнальных путей на уровне определенного белка. Поэтому, когда происходит репрограммирование макрофага, с помощью сигнального пути, активирующего этот белок, ответ макрофага на лиганды другого сигнального пути, содержащего этот же белок, будет усилен.

Формирование одного фенотипа сопровождается усилением синтеза молекул-ингибиторов формирования альтернативного фенотипа, поэтому альтернативный фенотип подавляется и его формирование затруднено.

Один сигнальный путь может передавать сигналы на другой, за счет чего происходит каскадная активация сигнальных путей. Кроме того, регуляция программирования макрофагов происходит с помощью положительных и отрицательных обратных связей, в основе которых лежит способность сигнального пути увеличивать синтез как активаторов, так и ингибиторов этого пути.

Сигнальные пути, которые программируют М1 фенотип часто имеют ответвление, которое при его активации может увеличить продукцию М2 фенотипа и наоборот. Такой фенотип макрофагов называется фенотипом переключения или switch-фенотипом. Биологический смысл такой конструкции в том, чтобы предупредить избыточное воспаление и повреждение тканей при формировании М1 фенотипа или предупредить значительное снижение бактерицидной активности макрофагов и возможности развития аутоимунных реакций [46].

Молекулярные пути, которые участвуют в репрограммировании макрофагов до сих пор изучаются. Обобщая данные нескольких исследований [47][48][12], можно выделить следующие молекулы, играющие ключевые роли в активации того или иного фенотипа макрофагов.

Таблица 2. Молекулы, играющие ключевые роли в активации фенотипов макрофагов.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | **M1** | **M2** |
| Сигнальныемолекулы [48] | STAT1 alpha/beta  IRF5  Btk  P2Y(2)R  SOCS3  Activin A  HIF1-α | STAT6  IRF4  KLF-4  NF-κB p50 homodimers  PPARγ  HIF-2α  IL-21  BMP-7  FABP4  LXRα |
| Сигнальные молекулы [47] | Akt2  p110δ  PTEN  TSC1  TSC2  p85a | Akt1  p110α  p110β  p110γ  TSC1  Rictor/mTORC2 |
| Экспрессия генов [48][12] | TNF-a  Cox-2  CCL5  NOS2 | Arg-1  Mrc-1  Fizz1  PPARγ |

# Глава 2. Сахарный диабет второго типа и роль макрофагов в его развитии

Сахарный диабет – это группа метаболических заболеваний, характеризующаяся дефицитом инсулина, который вначале вызывает нарушение углеводного, а затем и других видов обмена веществ, что в конечном итоге приводит к нарушению всех функциональных систем организма. Диабет остается одной из главных причин смертности во всем мире и носит характер эпидемии. Сахарный диабет разделяют на два вида: диабет 1 типа (СД1) и диабет 2 типа (СД2), причем второй составляет 90% в структуре больных во всем мире.

СД2 или инсулиннезависимый сахарный диабет – это гетерогенная по этиологии и патогенезу группа заболеваний, характеризующихся мультифакториальной наследственной предрасположенностью, относительной инсулиновой недостаточностью и инсулинорезистентностью, которая представляет собой кульминацию двух одновременно протекающих процессов: инсулинорезистентности и функциональной недостаточности β-клеток.

СД2 возникает из-за нарушения β-клеток в результате компенсаторного увеличения ими продукции инсулина в ответ на инсулинорезистентность [49][7][50]. Однако, некоторые авторы [51] утверждают, что вопрос о первичной резистентности к инсулину, вызванной различными факторами, а чаще всего ожирением, в развитии СД2 остается спорным. Они считают, что первичной причиной развития СД2 является функциональный дефект β-клеток. Нарушение чувствительности к инсулину может сопровождать β-клеточную дисфункцию или быть ее следствием, поскольку первичная инсулинорезистентность без нарушения ответа β-клеток на глюкозу не может вызвать инсулиннезависимый сахарный диабет, так как секреторные резервы интактных β-клеток очень велики: 10% массы β-клеток достаточно для поддержания нормогликемии без ограничения экспериментальных животных или больных с резекцией поджелудочной железы в диете.

В результате β-клеточной дисфункции при развитии СД2 уменьшается секреция инсулина, уровень глюкозы после еды и натощак возрастает из-за недостаточного ее поступления в инсулинозависимые ткани – мышечную и жировую, а также из-за неполного превращения глюкозы в гликоген печенью и стимулирования в ней гликогенолиза и глюконеогенеза, в отсутствии достаточного уровня инсулина [51]. Высокий уровень глюкозы в крови способствует дальнейшему прогрессированию диабета через глюкотоксический эффект на β-клетки, который заключается в активации оксидативного стресса, хроническом воспалении, уменьшении количества и нарушении структуры митохондрий. Помимо углеводного обмена инсулин способствует синтезу липидов в печени и уменьшает липолиз в жировой ткани, поэтому, при недостаточном инсулиновом сигнале нарушается инсулин-индуцированная супрессия липолиза в адипоцитах и свободные жирные кислоты (СЖК) поступают в кровоток. В организме СЖК воздействуют на органы и ткани однонаправленно с повышенными концентрациями глюкозы, что обозначают термином глюколипотоксичность.

Даже небольшое снижение уровня инсулина в крови может привести к снижению активности инсулина в гипоталамусе и, как следствие, к увеличению веса и развитию инсулинорезистентности [51].

СД2 развивается медленно, в течение многих лет. На начальных стадиях диабета ресурса β -клеток достаточно, чтобы компенсировать увеличение уровня глюкозы в крови. На этих стадиях появляется компенсаторная гиперинсулинемия при нормогликемии, снижается толерантность к глюкозе. В норме после нагрузки концентрация глюкозы в крови возрастает в течение первого часа на 50-80%, через два часа ее уровень снижается, а через 2,5 – 3 часа приходит к норме. В случае нарушения толерантности повышенный уровень глюкозы сохраняется в течение 3 часов.

Когда β -клетки перестают компенсировать увеличение уровня глюкозы в крови, развивается выраженная инсулинорезистентность и относительная инсулиновая недостаточность, интолерантность к глюкозе, исчезновение первой фазы секреции инсулина при нагрузке глюкозой. В норме наблюдаются две фазы – первая фаза быстрого нарастания уровня инсулина в кровотоке в ответ на увеличение концентрации глюкозы в крови и вторая фаза – постепенного нарастания секреции инсулина. Две фазы секреции инсулина представляют два различных внутриостровковых пула инсулина. Первый пул, или пул немедленного реагирования, представляет собой в количественном отношении около 5–10% внутриостровкового содержания инсулина. Это гранулы инсулина, находящиеся максимально близко к мембране β–клетки, и считается, что именно этот быстровыделяемый пул обеспечивает первую, раннюю фазу в секреции инсулина. Второй, резервный пул, для выделения которого необходима аденозинтрифосфат–зависимая мобилизация инсулинсодержащих гранул, перемещающихся постепенно в первый пул, с последующим экзоцитозом, фактически представляет 90–95% запасов инсулина, содержащихся в β–клетках в данную единицу времени.

В норме секреция инсулина осуществляется в соответствии с уровнем глюкозы в крови. На стадии развития инсулинорезистентности появляется ожирение как реакция на нарушение инсулинового сигнала в гипоталамусе, которое усугубляет инсулинорезистентность и приводит к снижению инсулиновой секреции и явному диабету[51].

Молекулярный механизм резистентности клеток к инсулину связан с изменением активности одного или нескольких компонентов цепи передачи сигналов, вызванным врожденным нарушением его образования или факторами внешней среды. В основе приобретенной резистентности к инсулину лежит нарушение передачи сигналов через субстраты инсулинового рецептора (IRS), а именно конкуренция за связывание с ними субъединиц PI3K. К причинам, которые стимулируют эти механизмы, относятся воспаление, ожирение, гиперинсулинемия, переедание, стресс, нарушение функций митохондрий.

Связывание инсулина с рецептором вызывает изменения конформации рецептора. Это стимулирует активность тирозинкиназы в одной из субъединиц рецептора и запускает сигнальный каскад, в результате которого активируется PI3K и затем Akt, одной из функций которого является активация компонентов GLUT-4. Таким образом, активации GLUT-4 при нарушении сигнала от инсулинового рецептора не происходит и глюкоза не может проникнуть в клетку.

Избыточное накопление жиров в адипоцитах приводит к липолизу и высвобождению в кровоток свободных жирных кислот, кислородных радикалов, а также провоспалительных адипокинов лептина и резистина и цитокинов IL-1β, IL-6, TNF-α, MCP-1 и MIF [52], которые образуются в результате воспалительных процессов в жировой ткани. СЖК, взаимодействуя с TLR-4, индуцируют экспрессию хемокинов, которые приводят к накоплению и активации макрофагов в жировой ткани. При ожирении активированные макрофаги М1-типа стимулируют лейкоцитарную инфильтрацию на фоне увеличения Th-1-, Th-17- и CD8+- Т-клеток и уменьшения макрофагов M2-типа, Тreg и Th-2 клеток в жировой ткани.

Кроме СЖК инициаторами воспалительного процесса и накопления провоспалительных макрофагов в жировой ткани при ожирении могут быть молекулы DAMPS, образующиеся после гибели адипоцитов; индуцируемый гипоксией фактор-1 (HIF-1). К тому же, моноциты у мышей с ожирением предрасположены к приобретению провоспалительного фенотипа при дифференцировке в макрофаги. Эти макрофаги продуцируют основное количество TNF-α жировой ткани, а также iNOS и IL-6 [19] , которые способствуют локальной (в жировой ткани) и системной (в печени и мышцах) резистентности к инсулину, препятствуя передаче сигнала через рецептор инсулина, [7] а именно, через активацию JNK, которая препятствует связыванию рецептора инсулина с PI3K, что приводит к нарушению экспрессии GLUT-4 и инсулинорезистентности [52]. В норме большинство макрофагов жировой ткани, которые находятся между адипоцитами в висцеральном жире, фенотипически напоминают M2-макрофаги. Они экспрессируют гены цитокинов IL-10 и IL-1Ra. К тому же, IL-10 из макрофагов жировой ткани способствует действию инсулина на адипоциты и подавлению липолиза [53].

Рецепторы, активируемые пероксисомными пролифераторами (Peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs) представляют собой группу ядерных [рецепторов](https://www.wikiwand.com/ru/%D0%A0%D0%B5%D1%86%D0%B5%D0%BF%D1%82%D0%BE%D1%80), функционирующих в качестве [фактора транскрипции](https://www.wikiwand.com/ru/%D0%A4%D0%B0%D0%BA%D1%82%D0%BE%D1%80_%D1%82%D1%80%D0%B0%D0%BD%D1%81%D0%BA%D1%80%D0%B8%D0%BF%D1%86%D0%B8%D0%B8). PPAR-γ продуцируется М2 макрофагами повышает чувствительность к инсулину в жировой и мышечной тканях благодаря подавлению TLR- и IFN-γ-зависимых воспалительных реакций [54]. Экспрессия PPAR-γ также приводит к формированию М2-макрофагов экспрессия генов PPAR-γ в норме связана с развитием новых адипоцитов. При ожирении экспрессия этих генов снижается в адипоцитах, но повышается в других тканях, включая скелетные мышцы и печень, в которых начинают запасаться триацилглицерины, что ведет к инсулинорезистентности этих органов.

Гипертрофия адипоцитов в результате накопления в них липидов может приводить к локальной гипоксии на ранних стадиях, результатом которой является усиление продукции различных провоспалительных адипокинов [31, 40]. Реакция на гипоксию выражается в активации гипоксия-индуцибельного фактора (HIF), что приводит к увеличению экспрессии генов, участвующих в воспалении, а также к высвобождению хемокинов MCP-1, MIP-1α, MCP-2, RANTES и рецепторов хемокинов CCR2 и CCR5, последующему привлечению моноцитов в жировую ткань, где они дифференцируются в макрофаги и образуют кольцеобразные структуры вокруг нефункциональных адипоцитов [18]. Основной целью этих макрофагов является удаление клеточного мусора и ремоделирование тканей.

Инсулинорезистентность в печени может быть следствием воспаления, вызванного накоплением в ней липидов при ожирении, подобно воспалению в адипоцитах, либо инициаторами воспалительного процесса в печени могут быть провоспалительные цитокины, попадающие в кровоток из висцеральной жировой ткани, которые активируют клетки Купфера – резидентные печеночные макрофаги и способствуют производству ими провоспалительных цитокинов.

Мышца является мишенью резистентности к инсулину, вызванной воспалением, а не местом инициации этого процесса.

При развитии СД2 в условиях гипергликемии и повышенного уровня СЖК, β-клетки экспрессируют хемокины, привлекающие моноциты, например, при воздействии пальмитата уровень экспрессии β-клетками хемокинов CCL2 (МСР-1) и CXCL11 увеличивается, что способствует привлечению моноцитов в островки. Моноциты приобретают провоспалительный фенотип и увеличивается продукция TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-18 внутри островка, что способствует локализованному воспалению. Взаимосвязь между IL-1βи β- клеточной дисфункцией наиболее изучена [50][55]: высокий уровень глюкозы индуцирует продукцию IL-1β в β-клетках, который действует аутокринно через рецептор IL-1, экспрессирующийся на β-клетках [14]. Сигналы с него передаются через JNK [15] и NF-κB - пути [16,17], приводя к увеличению продукции iNOS и, соответственно, NO, который вызывает β-клеточную дисфункцию через нарушение функции эндоплазматического ретикулума [18]. Антагонист рецептора IL-1 (IL-1Rа) значительно ингибирует вызванное глюкозой нарушение секреции инсулина. Так, впервые было показано, что неаутоиммунный механизм может индуцировать продукцию провоспалительных цитокинов в островках [13]. Стимуляция через IL-1R является дозозависимой. Высокие дозы IL-1β (5 нг/мл) подавляют пролиферацию β -клеток и секрецию инсулина, а низкие дозы (0,02 нг/мл), наоборот, способствуют пролиферации β -клеток и секреции инсулина.

IL-1β может индуцировать продукцию IL-6, которая в свою очередь, стимулирует синтез GLP-1 в α-клетках и способствует увеличению секреции инсулина [27].

Таким образом, в низких дозах IL-1β может способствовать адаптации к гипергликемии путем усиления пролиферации и функции β-клеток [112]. Созревание про-IL-1 β (его расщепление каспазой-1) и последующая секреция зависит от сборки инфламасомы, которую запускают различные стимулы, в частности PAMP, DAMP, амилоидные отложения. Ацетил-амилоидный полипептид (IAPP) секретируется β-клетками в ответ на высокий уровень глюкозы, а внеклеточная концентрация этого полипептида приводит к амилоидным отложениям в островках, которые ассоциируются с СД2.

Провоспалительный цитокин IL-8, он же хемокин, который экспрессируется на макрофагах М1 и продуцируемый альфа-клетками при повышенном уровне глюкозы и пальмитата способствует рекрутингу моноцитов и нейтрофилов в островки [113]. Еще одним стимулом для активации макрофагов в островках являются ЛПНП, которые действуют через TLR4 в макрофагах и инициируют продукцию IL-1 β. К тому же, СЖК нарушают в β -клетках секрецию инсулина и приводят к апоптозу, что ассоциировано с высоким уровнем церамида, способствующего увеличению NO через NF-κB.

Члены семейства VEGF также способствуют рекрутингу макрофагов в островки. VEGF-A, в частности, продуцируется β-клетками. Сниженная секреция VEGF-A нарушает васкуляризацию островков, что приводит к недостаточной секреции инсулина и непереносимости глюкозы у мышей. Повышенная секреция VEGF-A наблюдается при СД2 и приводит к фиброзу и снижению β-клеточной массы. Повышенная продукция VEGF в островках способствует привлечению макрофагов, накоплению коллагена и экспрессии провоспалительных медиаторов.

С другой стороны, VEGF-A способствует репликации β-клеток, привлекая макрофаги, которые имеют смешанный фенотип M1:M2. В настоящее время недостаточно ясны механизмы, согласно которым вновь прибывшие макрофаги выбирают профибротическую или регенерационную программу.

Помимо апоптоза β -клеток, в развитии СД 2 принимает участие β-клеточная дедифференцировка. Транскрипционный фактор Foxo1 способствует дифференцировке β -клеток и активируется при гипергликемии для увеличения продукции инсулина. Неспособность β -клеток синтезировать и секретировать инсулин (дедиффеоенцировка) связана с нарушением активации этого фактора. Нарушения могут быть как генетически обусловленными, так и приобретенными в результате длительного воздействия гипергликемии и провоспалительных цитокинов [114]. В результате β-клетки приобретают фенотип α-клеток или клеток-предшественников, экспрессирующих маркеры Neurog3, Oct4 и Nanog [115].

Таким образом, уровни цитокинов TNF-α, IL-1 β, и IL-6, а также NO, увеличиваются в поджелудочной железе в процессе воспаления. Они активируют различные сигнальные пути: IL-1β и TNF-α действуют через NF-κB и запускают апоптоз β-клеток путем повышения уровня экспрессии FAS. TNF-α и IFN-γ, действуя вместе, запускают апоптоз β-клеток через STAT-1/iNOS /NO/p53 сигнальный путь [38, 39]. Свободные радикалы, образующиеся при гипергликемии, могут способствовать апоптозу и некрозу β-клеток через активацию каспаз. Все это вместе вызывает экспрессию хемокинов и рекрутинг провоспалительных макрофагов, дендритных клеток и Т-клеток в островки поджелудочной железы, способствуя уменьшению секреции инсулина и воспалению [40, 41]. Помимо глюколипотоксичности, которая играет ведущую роль в дисфункции и гибели β-клеток, недостаточная сигнализация от инсулиновых рецепторов на β-клетках может привести к нарушению их функциональной активности.

В ответ на резистентность к инсулину и гипергликемию компенсаторно увеличивается размер β-клетки (гипертрофия) либо количество β-клеток (гиперплазия), что приводит к усиленному синтезу и секреции инсулина. Увеличение количества β-клеток происходит за счет инсулина, IGF-1 и 2 [56][57][58][59], что в конечном итоге приводит к увеличению экспрессии PDX-1, который регулирует пролиферацию и выживание β-клеток. В этом же сигнальном пути активируется Akt, которая ингибирует проапоптотические белки, обеспечивая защиту от апоптоза β-клеток. На пролиферацию β-клеток и защиту их от апоптоза также влияет глюкагоноподобный пептид-1(GLP-1) Авторы [58][60] предполагают также, что PI3K, являясь связующим звеном между субстратами инсулинового рецептора и Akt, играет определенную роль в дифференцировке ацинарных и протоковых клеток после резекции поджелудочной железы в инсулинсинтезирующие при участии PDX-1. В то же время, аномальный рост островковых клеток может привести к развитию опухолей островковых клеток, которые обычно называются в зависимости от гормонов, которые они продуцируют. Самой распространенной опухолью островковых клеток поджелудочной железы является инсулинома (β-клеточное происхождение), до 90% этих опухолей доброкачественны [116]. При дальнейшем развитии диабета наблюдается гипоплазия β-клеток, апоптоз и относительное увеличение количества α-клеток. [61,62, 117].

# Глава 3. Участие макрофагов в регенерации поджелудочной железы

## 3.1 Особенности развития поджелудочной железы

Поджелудочная железа включает три основных типа клеток: ацинарные клетки, клетки протоков и эндокринные клетки. Ацинарные клетки продуцируют и выделяют пищеварительные ферменты, такие как липазы, протеазы и нуклеазы, которые направляются в кишечник разветвленной проточной сетью. Ацинарные и проточные клетки составляют экзокринную часть поджелудочной железы и примерно 98% от общей массы органа. Эндокринные клетки организованы в островки Лангерганса, составляют менее 2% ткани поджелудочной железы и участвуют в регулировании метаболизма питательных веществ и гомеостаза глюкозы. Существует пять типов эндокринных клеток, каждый из которых выделяет определенный гормон: α-, β-, δ -, ξ- и PP-клетки, продуцирующие глюкагон, инсулин, соматостатин, грелин и PP (панкреатический полипептид), соответственно [63].

Понимание процесса внутриутробного развития поджелудочной железы млекопитающих и, в частности, происхождение и развитие островков Лангерганса и β-клеток, является отправной точкой для исследований потенциальных регенеративных процессов во взрослой поджелудочной железе. Все экзокринные и эндокринные типы клеток поджелудочной железы происходят от общего пула клеток-предшественников в энтодерме кишечника эмбриона [64].

Транскрипционный фактор промотора инсулина 1, известный как Ipf1 или PDX-1, играет решающую роль в развитии поджелудочной железы. Мезенхимальные Ipf1-экспрессирующие клетки в первичной кишечной трубке дают начало всем клеткам поджелудочной железы, включая экзокринные и эндотелиальные клетки. Те клетки, которые в дальнейшем образуют эндокринную часть поджелудочной железы, экспрессируют транскрипционный фактор нейрогенин 3 (Ngn3) и дифференцируются в пять типов клеток α, β, δ, ξ и РР, составляющих островки Лангерганса [65][66][67]. У грызунов β-клетки находятся в центре островка, а α и δ – по периферии. У человека и приматов все клетки рассредоточены по островку [68]. Распределение эндокринных клеток зависит от времени экспрессии и количества Ngn3 [69]. Для развития β-клеток требуется экспрессия многочисленных факторов транскрипции, включая MafB, Pax1, Isl1, Pax4, Pax6, Hlxb9, Nkx2.2 и Nkx6.1, особенно важен транскрипционный фактор Pax4 [70].

PDX-1 необходим для пролиферации и выживания β -клеток, поскольку его удаление вызывает резкое снижение числа β –клеток [71]. Условная инактивация этого фактора на разных стадиях развития, а также в зрелых β -клетках дополнительно указывала на участие этого фактора в определении и поддержании фенотипа β –клеток [72]. Во взрослой поджелудочной железе PDX-1 играет критическую роль в регуляции транскрипции генов, связанных с развитием β-клеток, например, в экспрессии транспортера глюкозы GLUT-2, островкового амилоидного полипептида (IAPP) и глюкокиназы [73][74].

## 3.2 Участие макрофагов в развитии и функционировании поджелудочной железы

Макрофаги присутствуют почти во всех органах во время эмбрионального развития, и они считаются первичными фагоцитами, которые фагоцитируют апоптотические клетки во время морфогенеза. Тканевые макрофаги также продуцируют ростовые факторы, которые необходимы для эмбрионального развития [118]. В нормальных условиях макрофаги островков и стромы поджелудочной железы отличаются по происхождению, фенотипу и обмену с циркулирующими в крови клетками. В островках макрофаги являются единственными миелоидными клетками, имеют низкий уровень саморепликации, зависят от CSF-1 и практически не заменяются циркулирующими в крови моноцитами. Они экспрессируют гены Il-1b, TNF-a, МНС II, что указывает на их провоспалительный фенотип. Эти макрофаги происходят из гематопоэтической стволовой клетки эмбриональной печени, а затем костного мозга [75][76].

В островках обнаруживается небольшое количество макрофагов: от 5 до 10, причем в больших островках их может насчитываться до 30 [76]. Макрофаги расположены рядом с кровеносными сосудами и рядом с бета-клетками; их филоподии проходят между бета-клетками, некоторые доходят до края островка. Кроме того, филоподии также распространяются вдоль стенки сосуда и в просвет кровеносного сосуда. Макрофаги забирают у бета-клеток секреторные гранулы с инсулином [77][78], переваривают содержание гранул, присоединяют пептиды гранул к белкам MHC II, с образованием комплекса, который распознается Т-клеткам [76].

Межацинарная строма содержит две популяции макрофагов. Обе являются противовоспалительными, экспрессируют Arg-1 и имеют М2 фенотип c некоторыми различиями в экспрессии генов (CD206 +/CD301+ имели низкий уровень экспрессии МНС II, высокий уровень экспрессии Il-10, рецептора маннозы С-типа 1 (Mrc1), ( Mgl1, Mgl2) и Fizz1, тогда как CD206-/CD301-стромальные макрофаги имели высокий уровень экспрессии МНС II, Mlg1, Mgl2, Ym1 и Fizz1. Эти макрофаги различаются также по происхождению и локализации в строме. Популяция СД206+ появляется при первичном гемопоэзе в желточном мешке, практически не заменяется циркулирующими клетками крови, и находится вблизи протоков поджелудочной железы, тогда как популяция СД206- появляется при окончательном гемопоэзе сначала в эмбриональной печени, а затем в костном мозге и может заменяться моноцитами крови[75][79][76]. Популяция макрофагов, произошедших из желточного мешка, является CSF-1- зависимой [118].

И островковые и стромальные макрофаги экспрессируют F4/80+ CD11b+ CD11c+CD68+LyzM+.

CSF1-зависимые макрофаги участвуют в пролиферации β -клеток, их неогенезу и, таким образом, поддерживают β-клеточную массу [80][81]. Макрофаги, способствуют восстановлению поджелудочной железы, продуцируя металлопротеиназу 9 (MMP9), которая приводит к высвобождению эндотелиального фактора роста сосудов из внеклеточного матрикса, что индуцирует ангиогенез при повреждении поджелудочной железы. В свою очередь клетки сосудистого эндотелия продуцируют необходимые факторы, воздействующие на пролиферацию β-клеток [82].

Исследования, проведенные с помощью ПЦР и проточной цитометрии показали, что в нормальных условиях в островках Лангерганса миелоидные клетки являются макрофагами; других лейкоцитов обнаружено не было, хотя в [76] говорится, что в островках присутствуют и дендритные клетки. В экзокринной части был обнаружены различные лейкоциты, такие, как макрофаги, моноциты, дендритные клетки, В-клетки, Т-клетки.

Эксперименты по замещению удаленных путем γ-облучения резидентных макрофагов показали, что донорские миелоидные клетки дифференцируются в резидентные макрофаги островков и стромы и поддерживают тот фенотип, который наблюдался в нормальном состоянии. Это указывает на то, что каждая тканевая область (эндокринная или экзокринная) модулирует свойства макрофагов[75][81].

## 3.3 Особенности регенерации поджелудочной железы

На моделях, стимулирующих регенерацию поврежденной ткани поджелудочной железы (травма поджелудочной железы, лигирование или частичная окклюзия основного протока, а также неполная панкреатомия), было показано, что масса островков в поджелудочной железе увеличивается [83][84][85][86][87][88].

Предполагается, что регенерация островков и, в частности, регенерация β-клеток после повреждения поджелудочной железы, происходит по одному из трех механизмов: трансдифференцировка неэндокринных клеток в β-клетки, регенерация β-клеток из клеток-предшественников или репликация существующих β- клеток.

Выше было сказано, что островковые клетки происходят из протоковых при развитии поджелудочной железы. По результатам нескольких исследований [89][90] при регенерации поджелудочной железы после лигирования протока появлялись клетки смешанной линии, экспрессирующие как эпителиальные, так и β-клеточные маркеры; а также клетки, экспрессирующие эпителиальные и α-клеточные маркеры и протоковые клетки, экспрессирующие GLUT-2. Таким образом, увеличение числа островковых клеток после повреждения было связано с трансдифференцировкой ацинарных и протоковых клеток в эндокринные α- или β- клетки.

Эксперименты in-vitro по превращению экзокринных клеток, продуцирующих амилазу в клетки, секретирующие инсулин путем обработки факторами роста бетацеллюлином и активином А, подтверждают возможность дифференцировки экзокринных клеток в эндокринные [91]. Другие эксперименты [92][93][94]показали возможность дифференцировки α-клеток в β-клетки при условии, что более 95% β-клеток разрушены[95].

Однако, исследованиия, основанные на генетической маркировке ацинарных клеток, с помощью которой можно идентифицировать клетки ацинарного происхождения, показали, что экзокринные ацинарные клетки не дифференцируются в β-клетки. [96] Результаты другого генетического исследования, основанного на маркировке, еще более противоречили понятию трансдифференцировки, являющемуся механизмом, посредством которого происходит регенерация островков, указывая, что β-клетки возникают только из протоковых эпителиальных клеток во время эмбриогенеза и что эти эпителиальные клетки не вносят существенного вклада в регенерацию эндокринных или ацинарных клеток после рождения [97].

Таким образом, информация о трансдифференцировке, как о механизме регенерации поджелудочной железы достаточно противоречива.

В ряде экспериментов было показано существование эмбриональных стволовых клеток в поджелудочной железе, которые начинают дифференцироваться в β-клетки при ее повреждении [98][99][100][101][102].

Некоторые авторы [103][104] придерживаются мнения, что во взрослой поджелудочной железе возможна только репликация β-клеток, но не образование их из стволовых клеток-предшественников. Кроме того, репликация способствует поддержанию β-клеточной массы островков (количество β-клеток и увеличение их размера). Репликация клеток обычно модулируется взаимодействием разнообразного набора белков, которые включают циклины, CDK (циклин-зависимая киназа) и CDKI (ингибитор CDK). Комплексы циклин-циклинзависимая киназа образуются на стадии G1 клеточного цикла, они фосфорилируют белок ретинобластомы pRb, тем самым освобождая транскрипционный фактор E2F, необходимый для вступления клетки в фазу S клеточного цикла. Циклин D2, самый распространенный циклин в островке, имеет решающее значение для постнатального роста β-клетки [75]. Комплекс циклин D2 / CDK4 и семейство E2F, по-видимому, играют решающую роль в регулировании массы β-клеток, в частности, в компенсационном ответе β-клеток, который происходит на ранней стадии диабета[75][105][75][106].

Авторы [107] считают, что в регенерации поджелудочной железы и поддержании β-клеточной массы островков имеет место и репликация и образование β-клеток из стволовых клеток-предшественников [119].

## 3.4 Участие макрофагов в регенерации поджелудочной железы.

Для оценки регенеративного потенциала β-клеток и протоковых предшественников у грызунов часто используют лигирование поджелудочной железы. Это модель повреждения, при которой основной канал, соединяющий двенадцатиперстную кишку с поджелудочной железой, хирургически закрыт, что приводит к апоптозу ткани по всему хвосту поджелудочной железы. Происходит инфильтрация мононуклеаров и локализованное воспаление, о чем свидетельствуют повышенные уровни цитокинов (TNF-α, IL-β, IL-10 и IL-6 и др.). В регенерирующей поджелудочной железе присутствуют макрофаги CD206+, продуцирующие TGF-β1 и EGF (эпидермальный фактор роста) и индуцируют пролиферацию β-клеток через рецепторы TGF-β1 и EGF.

В другом эксперименте было показано, что макрофаги проникают в поджелудочную железу в ответ на эндокринный и экзокринный апоптоз клеток. Эти макрофаги экспрессировали провоспалительные цитокины (IL-6, TNF-α), но позже переключались на продукцию противовоспалительных цитокинов IL-10 и CD206.

Таким образом, в экспериментах с моделированием апоптоза было показано, что макрофаги поджелудочной железы с фенотипом M2 могут продуцировать трофические и ангиогенные факторы, которые поддерживают репликацию β-клеток, даже в провоспалительном микроокружении.

Также было показано, что макрофаги, полученные из костного мозга, подвергшиеся воздействию апоптотических островковых клеток in vitro, могут индуцировать дифференцировку β-клеток из эндотелиальных клеток. Макрофаги, культивируемые с апоптотическими анцинарными клетками, индуцировали экзокринную дифференцировку тканей. Эти результаты заставили авторов сделать вывод о том, что при фагоцитозе макрофаги создают специфические условия для регенерации клеток поджелудочной железы [118].

# Глава 4. Методические вопросы исследования

## 4.1 Общая характеристика лабораторных животных

В исследовании были использованы половозрелые белые крысы-самцы линии Wistar, массой 200-250 г., Животные содержались в условиях лабораторного вивария, где поддерживалась постоянная температура 22-25°С и естественная смена дня и ночи. В каждой клетке содержалось по 5 крыс, которые имели свободный доступ к пище и воде. Санитарная обработка клеток проводилась ежедневно, а дезинфекция – еженедельно. В экспериментах было использовано 60 животных. Все манипуляции осуществлялись в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях.

## 4.2 Моделирование сахарного диабета 2 типа

Модели сахарного диабета делят на спонтанные – генетические и индуцированные – химические, хирургические, диета-индуцированные [120]. Для моделирования сахарного диабета 2 типа была выбрана химическая модель с применением стрептозотоцина и никотинамида, которая характеризуется развитием умеренной гипергликемии, снижением толерантности к глюкозе, снижением продукции инсулина, отсутствием инсулинорезистентности и ожирения. Такое развитие сахарного диабета 2 типа характерно для стран Дальнего Востока [49].

Стрептозотоцин (СТЗ) является N-нитрозопроизводным глюкозамина и проникает в β-клетки через транспортер глюкозы GLUT2, приводя к алкилированию ДНК. Кроме того, СТЗ индуцирует активацию рибозилирования полиаденозиндифосфата и высвобождение оксида азота, а также разрушает никотинамиддинуклеотид (НАД) в β-клетках. В результате действия СТЗ панкреатические клетки разрушаются вследствие некроза. Поскольку НАД является антиоксидантом, который оказывает защитное действие путем удаления свободных радикалов, СТЗ вызывает лишь незначительное повреждение бета-клеток [108] [121].

Животные были разделены на 6 групп по 5 в каждой: интактная группа, контрольная группа с введением физиологического раствора, группа с сахарным диабетом 30 суток, группа с сахарным диабетом 60 суток, группа животных, которым вводили натриевую соль АФГ в дозе 2 мг/кг внутримышечно на 30 сутки развития сахарного диабета и контрольная группа, которой вводили АФГ по той же схеме.

Для создания модели СД2 предварительно внутрибрюшинно вводили водный раствор никотинамида (Sigma-Aldrich, США) 110 мг/кг, через 15 минут также внутрибрюшинно вводили раствор стрептозотоцина (Sigma-Aldrich, США) в цитратном буфере 65 мг/кг [122]. Животным контрольной группы были сделаны внутрибрюшинные инъекции 0,85% раствора хлорида натрия в таком же объеме.

Животные были выведены из эксперимента под действием эфирного наркоза методом декапитации. Для исследований забиралась кровь и поджелудочная железа.

Для верификации модели сахарного диабета 2 типа на 30 сутки эксперимента у животных измеряли уровень глюкозы, инсулина, гликированного гемоглобина в плазме крови, а также был проведен пероральный тест толерантности к глюкозе. Тест проводят, если концентрация глюкозы в плазме крови не превышает 6,4 ммоль/л у человека. Для крыс этот показатель поднимается до 10 ммоль/л. Тест показывает скорость поглощения клетками глюкозы, находящейся в крови. В норме после нагрузки глюкозой, ее концентрация в крови возрастает в течение первого часа на 50-80%, а через 2 часа ее уровень снижается до исходного или ниже. В случае нарушения толерантности значительное повышение концентрации глюкозы в плазме сохраняется более 2 часов. Согласно ВОЗ, в норме к концу второго часа уровень глюкозы у человека должен быть ниже 7,8 ммоль/л. Если уровень глюкозы в плазме крови находится между 7,8 и 11,1 ммоль/л, это указывает на нарушение толерантности к глюкозе, а уровень выше 11,1 ммоль/л подтверждает сахарный диабет. У грызунов уровень глюкозы в конце второго часа в норме должен быть не выше 8,3 ммоль/л [123]. Животным вводили раствор глюкозы из расчета 1г/кг интрагастрально натощак. Анализ крови на глюкозу осуществлялся через каждые 30 минут в течение 2 часов.

После моделирования сахарного диабета 2 типа концентрация глюкозы в плазме крови натощак была повышена и составляла 9,2±0,3 ммоль/л (таблица 1). Уровень инсулина был немного понижен по сравнению с контролем: 48,73±2,26 пкг/мл и 59,51±3,94 пкг/мл, соответственно. Гликированный гемоглобин HbA1c при диабете увеличивается в 2-3 раза, его концентрация пропорциональна усредненной концентрации глюкозы в крови за последние несколько недель. Достоверного увеличения концентрации гликированного гемоглобина на 30 сутки развития диабета выявлено не было (Таблица 3). Уровень глюкозы в плазме крови после перорального теста на толерантность к глюкозе в конце второго часа был выше уровня глюкозы до начала теста и составлял 11,93 ммоль/л (рис. 1), что указывает на нарушение толерантности к глюкозе.

Таким образом, повышение уровня глюкозы натощак, а также в конце второго часа после пероральной нагрузки глюкозой на фоне незначительного снижения уровня инсулина подтверждают развитие сахарного диабета 2 типа.

Рисунок 1. Тест толерантности к глюкозе

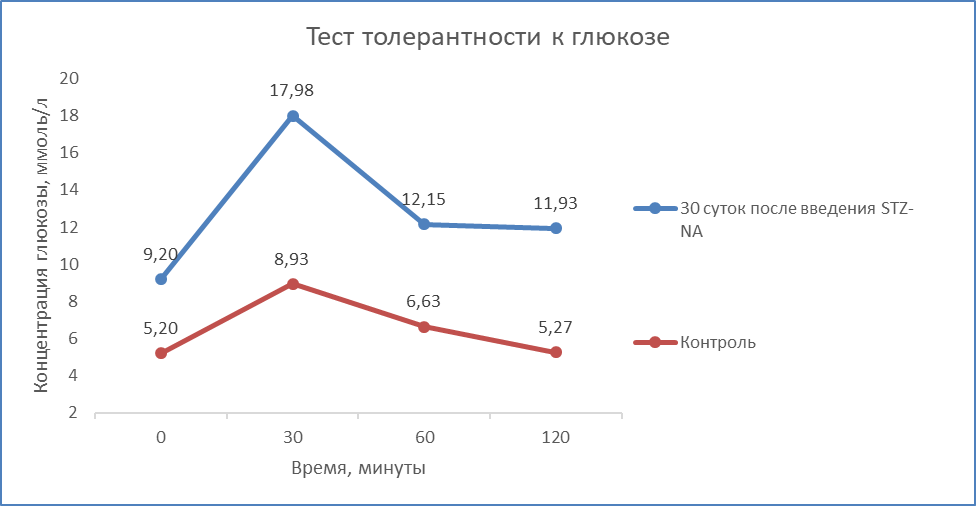


Таблица 1. Моделирование сахарного диабета 2 типа.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Показатель | Контрольная группа | STZ+NA, 30 суток |
| Концентрация глюкозы в плазме крови, ммоль/л | 5,2±0,42 | 9,2±0,31 |
| Концентрация HbA1c в плазме крови, % | 4,33±0,3 | 5,0±0,7 |
| Концентрация инсулина в плазме крови, пкг/мл | 59,51±3,942 | 48,73±2,261 |

## 4.3 Модуляция макрофагальной активности

Натриевая соль кетоформы 3-аминофталгидразида, производное люминола [124] проявляет дозозависимое действие на макрофагальную активность, способствуя изменению продукции провоспалительных цитокинов [125].

На модели LPS-индуцированного сепсиса у мышей было показано, что под воздействием натриевой соли кетоформы АФГ в плазме крови значительно снижается уровень провоспалительных цитокинов ИЛ-6, IFN-гамма, TNF-альфа. Также было показано, что концентрация ИЛ-6, ИЛ-12, IFN-гамма, TNF-альфа в мононуклеарах переферической крови человека стимулированных LPS снижается после инкубации с натриевой солью кетоформы АФГ [126]. При аллоксановом диабете натриевая соль кетоформы АФГ способствует значительному снижению в плазме крови крыс концентрации провоспалительного цитокина ИЛ-6 и увеличению противовоспалительного цитокина IGF-1 [127].

В экспериментах на нейродегенеративной модели было показано, что натриевая солькетоформы АФГ проявляет антиоксидантные свойства, способствует увеличению продукции VEGF и оказывает антиапоптотическое действие, повышая экспрессию bcl-2 [128].

Модуляцию активности макрофагов при сахарном диабете осуществляли путем введения натриевой соли кетоформы АФГ в дозе 2 мг/кг внутримышечно на 30 сутки развития сахарного диабета по следующей схеме: ежедневно в течение 10 дней, следующие 10 дней через день и далее через 2 дня еще 10 дней.

## 4.4 Исследование биохимических показателей крови

В плазме крови крыс определяли содержание глюкозы, креатинина, мочевины, общего количества белка, а также активность ферментов: аспартатаминотрансферазы или АСТ (К.Ф.2.6.1.1), аланинаминотрансферазы или АЛТ (К.Ф.2.6.1.2), щелочной фосфатазы (К.Ф.3.1.3.1.), альфа-амилазы (К.Ф. 3.2.1.1.). Для определения биохимических тестов использовали наборы реактивов фирмы «Витал Диагностикс» (СПб).

В цельной крови определяли содержание гликированного гемоглобина методом аффинной гель-хроматографии с использованием набора реактивов «Диабет-тест» фирмы ФОСФОСОРБ (Москва).

Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре DU-800 фирмы «Beckman» (США).

## 4.5 Гематологические исследования

Для анализа периферической крови использовали гематологический анализатор Biocode Hycel Celly 70. Забор крови осуществлялся из хвостовой вены в специально предназначенные пластиковые пробирки, обработанные гепарином в качестве антикоагулянта. Анализировали следующие параметры:

WBC–концентрация лейкоцитов, тыс/мкл

PLT – концентрация тромбоцитов, г/л

LYM – концентрация лимфоцитов, г/л

GRN - концентрация гранулоцитов, г/л

MID – концентрация средних клеток, г/л

RBC – концентрация эритроцитов, млн/мкл

HGB – концентрация гемоглобина, г/л

MCH – среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг

MCHC – средняя концентрация гемоглобина в эритроците, г/л

HCT – гематокритный показатель, %

PDW - ширина распределения тромбоцитов по объему

RDW – ширина распределения эритроцитов по объему

PCT – тромбокритный показатель, %

MCV – средний объем эритроцитов, фл

MPV – средний объем тромбоцитов, фл

%LYM – процентное содержание лимфоцитов

%MID – эозинофилы, базофилы, моноциты

%GRN - процентное содержание гранулоцитов

## 4.6 Гистологический метод анализа срезов поджелудочной железы

Ткань поджелудочной железы фиксировали в 10% формалине в течение 24 часов при комнатной температуре. Затем фиксирующий раствор заменяли парафином, проводя ткань через растворы спирта с возрастающей концентрацией 50%, 70%, 95%, 100%этанола, далее трижды помещали в ксилол и дважды в горячий парафин с использованием автоматического процессора для приготовления гистологических образцов LeicaTP 1020. Полученный материал заливали в парафин и делали срезы толщиной 3-4 мкм. Срезы выдерживали в течение суток на предметных стеклах, покрытых адгезивным соединением поли-L-лизином (POLYSINE, MenzelGmbH&Co, KG). Депарафинирование осуществляли путем помещения стекол дважды в ксилол, затем дважды в 95% этанол и в дистилированную воду. Эта же пробоподготовка использовалась и для иммуногистохимических методов [127].

Для исследования морфологического строения экзокринной и эндокринной части поджелудочной железы применялся гистологический метод окраски гемотоксилином и эозином с использованием Autostainer DAKO. Исследование гистологических и иммуногистохимических препаратов осуществлялись под микроскопом марки Leica DM2500 c видеокамерой Leica DFC420. Оценка исследуемых показателей проводилась с помощью программного обеспечения Leica Application Suite.

## 4.7 Иммуногистохимические и иммунофлюоресцентные методы анализа

### 4.7.1 Оценка изменений в инсулинпродуцирующем аппарате поджелудочной железы.

Изменения в инсулинпродуцирующем аппарате поджелудочной железы изучали с помощью иммуногистохимического метода окрашивания с применением антител (Anti-RatInsulin/Proinsulinantibody; MA5-12042, ThermoScientific, Waltham). Срезы подвергали депарафинированию, регидратации с использованием Autostainer DAKO, после чего дважды промывали в фосфатном буфере ph7,6 (PBS). Затем производили блокировку эндогенной пероксидазы (HRP) с использованием перекиси водорода в течение 10 минут. Комплекс, образованный между HRP и избыточным количеством перекиси водорода каталитически инертен и в отсутствии донора электрона, например, хромогена, обратимо ингибируется, вызывая подавление активности эндогенной пероксидазы. После блокирования эндогенной пероксидазы стекла промывали в дистиллированной воде 2 минуты, в PBS дважды по 5 минут и инкубировали в течение 60 минут при 37°С на водяной бане с первичными антителами (Anti-RatInsulin/Proinsulinantibody; MA5-12042, ThermoScientific, Waltham)в разведении 1:200. Остаток не связавшихся реагентов отмывали в PBS (дважды по 5 минут) и осуществляли инкубацию в течение 60 мин при 37°С на водяной бане с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (Goatanti-mouse, HRP conjugate, Millipore) в разведении 1:500, после чего промывали в PBS (дважды по 5 минут). Для визуализации антигенреактивных клеток использовали тест-систему NovolinkTMPolymerDetectionSystem (NovocastraLab.,Ltd), включающую хромогенный субстрат 3,3-диаминобензидин (DAB) в забуференном растворе. DAB-позитивные клетки идентифицировали по коричневому окрашиванию цитоплазмы клеток. Для исключения неспецифического окрашивания проводили постановку негативного и позитивного контроля. После окрашивания DAB (5 минут) промывали в дистиллированной воде 5 минут, окрашивали гематоксилином (7 минут) и промывали в водопроводной воде 5 минут. Обезвоживание в спиртах и просветление в ксилоле) проводили в автостейнере DAKO и заключали препараты под покровные стекла.

### 4.7.2 Оценка пролиферативной активности инсулинсинтезирующих клеток.

Для оценки пролиферативной активности β-клеток использовали метод двойной имунофлюоресцентной окраски. При ииммунофлюоресцентной окраске антитела конъюгированы с флюоресцентными красителями. Использовались первичные антитела к инсулину (Anti-RatInsulin/Proinsulinantibody; MA5-12042, ThermoScientific, Waltham), первичные антитела к маркеру пролиферации клеток Ki-67(Anti-RatKi-67 antibody; PA1-21520), вторичные антитела, меченые alexa fluor Goat –anti-mouse, A31555 invitrogen вторичные антитела, меченые техасским красным: Goat –anti-mouse, T6390 invitrogen.

Белок Ki-67 присутствует во всех активных фазах клеточного цикла (G1, S, G2 и митоз), но отсутствует в покоящихся клетках в фазе G0 [129]*.* Клеточная концентрация белка Ki-67 заметно возрастает в S-фазе клеточного цикла [130].

После депарафинирования препаратов, блокировали эндогенную пероксидазу перекисью водорода (10 минут), промывали в дистиллированной воде (2 минуты) и в PBS 7,6 (дважды по 5 минут). Для снижения фонового окрашивания, обусловленного гидрофобными взаимодействиями белков ткани с антителами, инкубировали стекла с раствором BlockAid™ BlockingSolution, invitrogen, в течение 60 минут на водяной бане при комнатной температуре, после чего инкубировали с первичными антителами к маркеру пролиферации клеток Ki-67. (Anti-RatKi-67 antibody; PA1-21520) в разведении 1:100 при 4 °С на водяной бане в течение ночи. Затем промывали в PBS трижды по 5 минут. Дальнейшие действия проводили в темноте для того, чтобы избежать выцветания флюоресцентных красителей. Образцы инкубировали с вторичными антителами Goat –anti-mouse, мечеными alexafluor, A31555 invitrogen в разведении 1:50 в течение 60 мин при 37°С на водяной бане, промывали в PBS трижды по 5 минут, инкубировали с первичными антителами к инсулину (Anti-RatInsulin/Proinsulinantibody; MA5-12042, ThermoScientific, Waltham) в разведении 1:300 в течение 60 мин при 37°С на водяной бане, промывали в PBS трижды по 5 минут, инкубировали с вторичными антителами Goat –anti-mouse мечеными техасским красным, T6390 Invitrogen в разведении 1:100 в течение 40 мин при 37°С на водяной бане, промывали в PBS трижды по 5 минут. Ядра окрашивали DAPI (4′,6-diamidino-2-phenylindole), ThermoFisherScientific, в течение 5 минут, промывали дистиллированной водой 2 минуты. Обезвоживание в спиртах и просветление в ксилоле проводили в автостейнере DAKO и заключали препараты под покровные стекла.

### 4.7.3 Оценка апоптотической активности инсулинсинтезирующих клеток

Метод TUNEL (TdT-mediatednickandlabeling) основан на обнаружении свободных 3-OH концов в разорванных молекулах фрагментированной ДНК с помощью терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазы (TdT).

Апоптотическую активность инсулинсинтезирующих клеток оценивали с помощью метода двойной иммунофлюоресцентной окраски с использованием набора Click-iT™ TUNELAlexaFluor™ 594ImagingAssay, formicroscopy&HCS, С10245, Invitrogen. Окрашивание осуществляли согласно протоколу производителя, в качестве первичных антител использовали (Anti-RatInsulin/Proinsulinantibody; MA5-12042, ThermoScientific, Waltham), в качестве вторичных антител использовали Goat –anti-mouse, меченые alexa fluor 488, A31555 Invitrogen, ядра окрашивали DAPI (4′,6-diamidino-2-phenylindole), ThermoFisher Scientific. Обезвоживание в спиртах и просветление в ксилоле проводили в автостейнере DAKO и заключали препараты под покровные стекла.

### 4.7.4 Количественная оценка содержания макрофагов фенотипа F4/80 в поджелудочной железе

F4/80 (Ly71 and EMR1) является гликопротеином, который экспрессируется на поверхности макрофагов в различных тканях [131].

Экспрессию F4/80 оценивали с помощью иммуногистохимического метода окрашивания с применением антител (Anti-RatF4/80 antibodyPA5-21399, ThermoFisher). Формалин меняет трехмерную структуру белков ткани, что может привести к модификации антигенных эпитопов и невозможности связывания их с антителами. После депарафинирования осуществляли демаскировку антигенов методом ферментативной обработки препарата с использованием трипсина при 37°С на водяной бане в течение 10 минут, после чего дважды промывали в PBS ph7,6. Затем производили блокировку эндогенной пероксидазы с использованием перекиси водорода в течение 10 минут. После блокирования эндогенной пероксидазы стекла промывали вдистиллированной воде 2 минуты, в PBSдважды по 5 минут, инкубировали с раствором Block Aid™ Blocking Solution, Invitrogen, в течение 60 минут на водяной бане при комнатной температуре, после чего инкубировали с первичными антителами (Anti-Rat F4/80 antibody PA5-21399, ThermoFisher) в разведении 1:100 в течение 60 минут при 37°С на водяной бане, промывали в PBS дважды по 5 минут и инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (Goatanti-rabbit, HRP Thermo Fisher Scientific) в разведении 1:2000 в течение 60 мин при 37°С на водяной бане, промывали в PBS дважды по 5 минут. Для визуализации антигенреактивных клеток использовали тест-систему Novolink TM Polymer Detection System (Novocastra Lab., Ltd), включающую хромогенный субстрат 3,3-диаминобензидин (DAB) в забуференном растворе. DAB-позитивные клетки идентифицировали по коричневому окрашиванию цитоплазмы клеток. После окрашивания DAB(5 минут) промывали в дистиллированной воде 5 минут, окрашивали гематоксилином (7 минут) и промывали в водопроводной воде 5 минут. Процедуру обезвоживание в спиртах и просветление в ксилоле проводили в автостейнере DAKO и заключали препараты под покровные стекла.

### 4.7.5 Количественная оценка содержания макрофагов фенотипа М2 в поджелудочной железе

Молекула CD163 экспрессируется на макрофагах фенотипа М2, также она связывает комплекс гемоглобин-гаптоглобин, участвует в эритропоэзе регенерации тканей[109].

Экспрессию СD163 оценивали с помощью иммуногистохимического метода окрашивания с применением антител (Anti-ratСD163/M130antibody (ED2); MA5-16658, ThermoScientific, Waltham). Срезы подвергали депарафинизации, регидратации с использованием Autostainer DAKO. Демаскировку антигенов производили методом протеолиза с использованием трипсина при 37°С на водяной бане в течение 10 минут, после чего дважды промывали в фосфатном буфере ph7,6 (PBS). Затем производили блокировку эндогенной пероксидазы (HRP) с использованием перекиси водорода в течение 10 минут. После блокирования эндогенной пероксидазы стекла промывали вдистиллированной воде 2 минуты, дважды в PBSпо 5 минут, инкубировали с раствором BlockAid™ BlockingSolution, invitrogen, в течение 60 минут на водяной бане при комнатной температуре, после чего инкубировали с первичными антителами (Anti-ratСD163/M130antibody (ED2); MA5-16658, ThermoScientific, Waltham) в разведении 1:70 в течение 60 минут при 37°С на водяной бане, промывали в PBS дважды по 5 минут, осуществляли инкубацию с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (Goatanti-mouse, HRP conjugate, Millipore) в разведении 1:500 в течение 60 мин при 37°С на водяной бане, промывали в PBS дважды по 5 минут. Для визуализации антигенреактивных клеток использовали тест-систему NovolinkTMPolymerDetectionSystem (NovocastraLab.,Ltd), включающую хромогенный субстрат 3,3-диаминобензидин (DAB) в забуференном растворе. DAB-позитивные клетки идентифицировали по коричневому окрашиванию цитоплазмы клеток. После окрашивания DAB (5 минут) промывали в дистиллированной воде 5 минут, окрашивали гематоксилином (7 минут) и промывали в водопроводной воде 5 минут. Обезвоживание в спиртах и просветление в ксилоле проводили в автостейнере DAKO и заключали препараты под покровные стекла.

## 4.8 Морфометрические методы анализа

### 4.8.1 Анализ морфологического строения поджелудочной железы

На гистологических препаратах определяли: количество панкреатических островков (ПО) в пересчете на 1 мм2паренхимы поджелудочной железы, (N/мм2), среднюю площадь ПО (мкм2), общую клеточность островка (относительное количество клеток в 1 мм2эндокринной ткани), индекс альтерации ацинарной части поджелудочной железы (% разрушенных ацинарных клеток в расчете на 1000 ацинарных клеток).

### 4.8.2 Анализ содержания β-клеток и инсулина в островках поджелудочной железы

Во всех группах оценивали процентное содержание β-клеток в островке, относительное количество β-клеток в 1 мм2 эндокринной ткани (N/мм2) и определяли содержание инсулина в инсулинпродуцирующих клетках. Интенсивность окраски соответствует количеству антител, связавшихся с антигенами, поэтому она является показателем содержания инсулина в β-клетках. Для измерения интенсивности окраски оценивали относительную оптическую плотность с помощью программы ВидеоТесТ – Морфология 5.0.

### 4.8.3 Анализ пролиферативной и апоптотической активности β-клеток.

Количество Ki-67-позитивных β-клеток и β-клеток, вступивших в апоптоз оценивали с использованием конфокального микроскопа LSM710 СarlZeiss. Для ядерного красителя DAPI длина волны возбуждения была 405 нм, испускания 430-450 нм, для Alexafluor 488, длина волны возбуждения была 488 нм, испускания – 515-565нм, для техасского красного и Alexa fluor 564 - 633нм и 675нм соответственно. Количество исследуемых клеток рассчитывали на единицу площади панкреатического островка.

### 4.8.4 Анализ содержания F4/80+ и СD163+ клеток

Подсчет F4/80- и СD-163- позитивных клеток проводился в 50 полях зрения, не перекрывающих друг друга, по диагонали среза. Для подсчета количества клеток в 1 мм2 ткани измеряли площадь поля зрения.

## 4.9 Иммуноферментные методы анализа

### 4.9.1 Определение гормонов

Содержание инсулина и кортикостерона в крови определяли методом иммуноферментного анализа с использованием прибора LAZURITE AUTOMATEDELISASYSTEM и наборов для ИФА Rat/Mouse Insulin ELISA; Millipore и Corticosterone ELIS Akitab108821, abcam.

### 4.9.2 Оценка цитокинового профиля поджелудочной железы

Для исследования про- и противовоспалительных цитокинов в поджелудочной железе, готовили гомогенат ткани поджелудочной железы. После извлечения поджелудочную железу промывали, затем помещали в PBS ph7,8 из расчета 250 мг на 1,5 мл. Все процедуры проводили на льду для предотвращения протеолиза. Ткань дезагрегировали с использованием автоматизировнной системы для дезагрегации тканей Medimachine, BectonDickinson. Суспензию пропускали через фильтр falcon, BD Bioscience, размером пор 50 мкм, затем центрифугировали 30 минут при 4˚C, 15 000 g, собирали супернатант и разводили в 2 раза.

Концентрацию цитокинов TNF-α, TGFβ-1, IL-1, IL-6, IL-10, INF-γ оценивали в гомогенате поджелудочной железы и в плазме крови на приборе LAZURITE AUTOMATED ELISA SYSTEM с использованием наборов для ИФА

IL-6 крысы, 96 тестов, BMS625 Bioscience

IL-1 крысы, 96 тестов, BMS627Bioscience

IL-10 крысы, 2х96 тестов, BMS629T WO Bioscience

TNF alpha крысы, с плашками, 96 тестов, BMS622 Bioscience

TGF beta-1 крысы, 2х96 тестов, BMS623 Bioscience

## 4.10 Статистические методы

Статистическая обработка проводилась в программном пакете Origin Lab при помощи непараметрического критерия Краскела - Уоллеса для множественных парных сравнений. Отличия считались достоверными при P<0,05.

# Глава 5. Изучение регенерации островков Лангерганса при развитии сахарного диабета 2 типа

### 5.1 Оценка регенераторных показателей островков Лангерганса интактной и контрольной группах животных

В интактной группе животных ткань поджелудочной железы соответствует гистологической норме. Отсутствует интерстициальный отек стромы и панкреатических островков, нет нарушений микроциркуляторного русла, полярность клеток не нарушена, границы между ацинарными клетками четкие, ядра расположены в базальной части, имеют одинаковый размер (Рисунок 1).

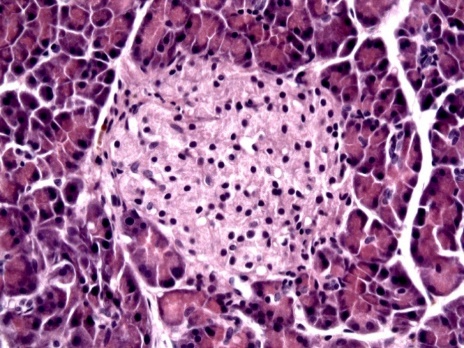


Рисунок 1. Экзокринная и эндокринная части поджелудочной железы в условиях физиологической нормы (интактная группа), окр. гематоксилином и эозином, ув. х 400.

Поскольку различий между контрольной и интактной группами выявлено не было, в дальнейшем все сравнения проводились с интактной группой.

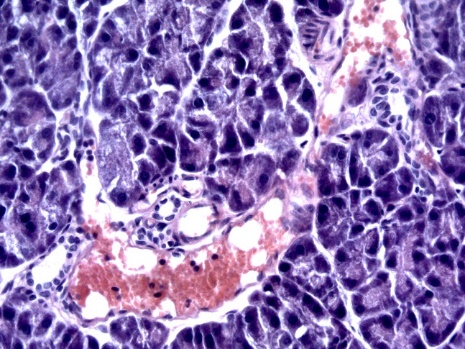
### 5.2 Регенерация островков Лангерганса при развитии сахарного диабета 2 типа.

Состояние поджелудочной железы изучали на 30 и 60 сутки развития сахарного диабета 2 типа.

В поджелудочной железе крыс с сахарным диабетом 30 суток отмечался умеренно выраженный интерстициальный отек в строме, очаговое полнокровие трабекулярных сосудов с образованием сладж-комплексов. В строме в небольшом количестве определялись полиморфноядерные лейкоциты. При этом полярность ацинарных клеток не была нарушена, определялись базальная и апикальная части клеток. В апикальной части определялись зимогенные гранулы (Рис. 2). В некоторых ацинусах границы между клетками были стерты. Отмечались смещение ядер к центру клетки и признаки зернистой дистрофии, возникающей, возможно, на фоне гипоксии, вызванной развивающимся воспалительным процессом. Наблюдался также некроз единичных ацинарных клеток.

В эндокринной части поджелудочной железы на 30 сутки исследования в островках Лангерганса определялись дистрофия и некроз части эндокриноцитов, развитие анизоцитоза и анизонуклеоза. Это сопровождалось нарушением со стороны микроциркуляторного русла, что выражалось повышенной проницаемостью сосудистой стенки и развитием интерстициального отека. В части островков были стерты границы и отмечалось слияние островков между собой (Рис. 3).

Полнокровие и сладж-комплексы трабекулярных сосудов



Некроз ацинарных клеток

Рисунок 2. Экзокринная часть поджелудочной железы на 30 сутки развития СД 2, окр. Гематоксилином и эозином, ув. х 400

Слияние островков

Интерстициальный отек в островке

Анизоцитоз

Анизонуклеоз

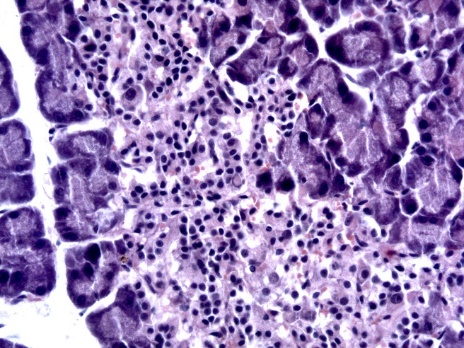


Рисунок 3. Панкреатические островки на 30 сутки развития СД 2, окр. Гематоксилином и эозином, ув. х 400

В поджелудочной железе животных с сахарным диабетом 60 суток нарастали нарушения со стороны микроциркуляторного русла в виде полнокровия и капиляростаза трабекулярных сосудов, стромального отека (рис. 4). Нарастали патологические изменения в ацинарных клетках в виде нарушения полярности, смещения ядер в центр клетки, а также становились более выраженными признаки зернистой дистрофии, границы между клетками были стерты (рис. 4).

В панкреатических островках поджелудочной железы на 60 сутки развития сахарного диабета 2 типа наблюдались анизоцитоз и анизонуклеоз эндокриноцитов. Нарастали нарушения микроциркуляторного русла: в капиллярных петлях островка определялись сладж-комплексы, интерстициальный отек был более выражен (рис. 5).

Эти признаки указывают на усиление воспалительной реакции в поджелудочной железе при развитии сахарного диабета 2 типа.

Зернистая дистрофия ацинарных клеток

Интерстициальный отек

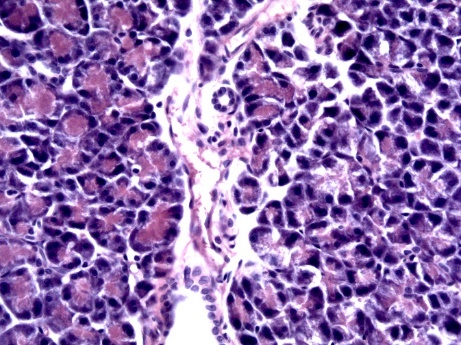


Рисунок 4. Экзокринная часть поджелудочной железы на 60 сутки развития СД 2,окр. Гематоксилином и эозином, ув. 400

Интерстициальный отек

Полнокровие и сладж-комплексы капиллярных петель

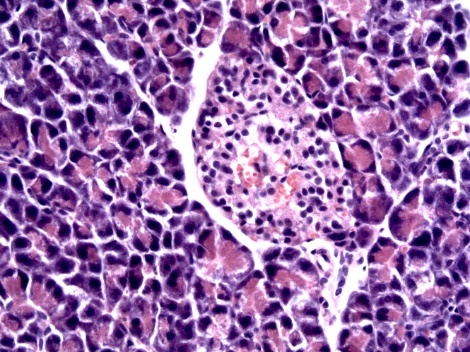


Рисунок 5. Панкреатический островок на 60 сутки развития СД 2, окр. Гематоксилином и эозином, ув. Х 400

##### 5.2.1 Оценка функциональной активности β-клеток при развитии сахарного диабета 2 типа

Морфометрические исследования показали, что в группах крыс с диабетом 30 суток количество панкреатических островков, их площадь и содержание в них клеток не изменились по сравнению с интактной группой. Количество β-клеток в островках снизилось практически вдвое с 77,65±0,9 % в исходе до 42,34±7,9 % в эксперименте. При пересчете β-клеток на мм2 островка содержание их снизилось в среднем на 31% с 6945±457кл/мм2 в исходе до 4837±642кл/мм2 в опыте. Уменьшение количества β-клеток было связано со снижением их оптической плотности с 1,23±0,34 до 0,7±0,14 усл. ед., что соответствовало понижению концентрации инсулина в плазме крови со 59,51±3,9 до 48,73±2,3 пг/мл (Таблица 7, 8). Уменьшение содержания β-клеток в островках является закономерным результатом течения сахарного диабета 2 типа.

Несмотря на нарастание патологических изменений в структуре островков Лангерганса на 60 сутки развития сахарного диабета 2 типа, морфометрические показатели оставались на уровне 30 суток развития этого заболевания. (Таблица 7) Сохранение массы и оптической плотности β-клеток связано со стабильным уровнем глюкозы (12,11±1,03 на 30 сутки и 12,23±0,5ммоль/л на 60 сутки развития сахарного диабета) и инсулина в плазме крови (48,73±2,3 на 30 сутки и 41,87±0,9 пг/мл на 60 сутки ). (Таблица 7, 8, 10 рис.8)

##### 5.2.2 Оценка пролиферативной активности β-клеток при развитии сахарного диабета

У здоровых крыс количество делящихся β-клеток незначительно [132]. При сахарном диабете на 30 сутки количество Ki-67+ β-клеток в пересчете на мм2 площади островка увеличилось по сравнению с интактной группой. При развитии диабета на 60 сутки пролиферативная активность β -клеток еще более увеличилась (Таблица 9).

#### 5.3 Изменение биохимических показателей крови при развитии сахарного диабета 2 типа

При сахарном диабете 2 типа происходит умеренное увеличение концентрации **глюкозы** в плазме крови. Для определения средней концентрации глюкозы за несколько недель определяют содержание **гликированного гемоглобина.** Поскольку между глюкозой и первичной аминогруппой гемоглобина происходит неферментативная реакция переноса глюкозы на молекулу белка (гликирование), скорость этой реакции пропорциональна концентрации глюкозы. В процессе гликирования гемоглобина и других белков организма образуются конечные продукты, которые могут образовывать поперечные сшивки с белками, мешая их нормальному функционированию. Накопление большого количества конечных продуктов гликирования приводит к различным осложнениям сахарного диабета.

На 30 сутки эксперимента наблюдалось повышение глюкозы с 5,99±0,17 до 12,11±1,03ммоль/л, на 60 сутки этот показатель оставался повышенным (12,23±0,5ммоль/л) (Таблица 10).

На 30 сутки развития сахарного диабета концентрация гликированного гемоглобина оставалась на уровне интактной группы, а на 60 сутки повысилась (Таблица 10).

Одной из характерных особенностей течения сахарного диабета является развитие многочисленных осложнений органов. Для оценки нарушений в органах-мишенях были исследованы интегральные показатели функционального состояния поджелудочной железы, печени и почек.

##### 5.3.1 Исследование функциональных показателей поджелудочной железы

При гистологическом исследовании поджелудочной железы на 30 и 60 сутки развития сахарного диабета 2 типа были обнаружены патологические изменения в экзокринной части, которые проявлялись нарушением полярности ацинарных клеток, анизоцитозом, анизонуклеозом, признаками зернистой дистрофии и некрозом. Для характеристики функции экзокриноцитов был использован широкораспространенный в биохимической практике тест по определению активности амилазы крови. **Альфа-амилаза**– фермент, участвующий в расщеплении крахмала, секретируется в клетках ацинуса поджелудочной железы и выводится по протокам в двенадцатиперстную кишку. При повреждении ацинарных клеток панкреатические ферменты попадают во внутреннюю лимфатическую систему поджелудочной железы и перитонеальную полость. Через сосуды, абсорбирующие лимфу, альфа-амилаза попадает в кровь. На 30 сутки развития сахарного диабета наблюдалось увеличение активности альфа-амилазы в плазме крови с 29,75±2,93мг/с\*л в интактной группе до 44,38±2,57мг/с\*л в эксперименте. На 60 сутки развития диабета активность альфа-амилазы в крови оставалась повышенной (40,68±3,32мг/с\*л). (Таблица 10) Полученные данные подтверждают наличие повреждений в экзокринной части поджелудочной железы развивающихся при СД2.

##### 5.3.2 Исследование функциональных показателей печени

Печень является одним из органов-мишеней сахарного диабета, поскольку гипергликемия, продукты оксидативного стресса провоспалительные цитокины токсичны для гепатоцитов. Поэтому для оценки развития в печени патологических изменений были исследованы общепринятые в биохимии показатели функционального состояния органа.

Определение активности **трансаминаз** в крови - аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы - (АСТ) позволяет обнаружить повышение проницаемости мембран гепатоцитов, вследствие чего происходит увеличение активности трансаминаз в крови. Диагностически значимым является определение активности АЛТ и АСТ одновременно с расчетом коэффициента де Ритиса (АСТ/АЛТ). При повреждении печени повышается активность АЛТ, поскольку фермент содержится преимущественно в этом органе, а коэффициент де Ритиса становится ниже нормальных показателей.

В эксперименте наблюдалось повышение активности АЛТ с 12,93±0,88 у интактных животных до 23,06±1,48 мкмоль/мин\*л у животных с диабетом 30 суток, активность АСТ не изменялась, а коэффициент де Ритиса уменьшался с 1,29±0,06 до 0,73±0,07мкмоль/мин\*л. На 60 сутки развития диабета активность АЛТ снижалась до 17,17±1,47 мкмоль/мин\*л, активность АСТ оставалась на уровне интактной группы, а коэффициент де Ритиса увеличивался до 1,15±0,16 мкмоль/мин\*л. (Таблица 10) Полученные данные свидетельствуют о повреждении мембран гепатоцитов, наиболее выраженном на 30 сутки развития диабета. Улучшения, наблюдавшиеся на 60 сутки, возможно, связаны с развитием компенсаторных процессов в печени.

**Щелочные фосфатазы** представляют собой группу цинк-содержащих ферментов, которые катализируют гидролиз фосфатных эфиров в различных тканях, в том числе печени. Поскольку фермент локализован преимущественно в митохондриях, определение его активности в крови позволяет выявить более глубокие повреждения гепатоцитов. При развитии СД 2 на 30 и 60 сутки изменений активности щелочной фосфатазы в крови выявлено не было (Таблица 10), что свидетельствует о целостности митохондриальных мембран.

Поскольку ключевые этапы белкового обмена происходят в печени ее функциональное состояние оценивали по **содержанию общего белка** в плазме крови. При развитии СД 2 на 30 и на 60 сутки этот показатель не отличался от нормальных значений (Таблица 10), что указывает на отсутствие нарушений белоксинтетической функции печени.

На основании проведенных биохимических тестов можно утверждать о незначительном повреждении печени в исследованные сроки СД2, которое проявляется нарушением мембран гепатоцитов.

##### 5.3.3 Исследование функциональных показателей почек

Диабетическая нефропатия – общее название осложнений СД на почки – включает поражения как клубочков и канальцев, так и сосудов, которые их окружают. Повреждения возникают по причине длительной гипергликемии, которая способствует развитию ангиопатии и, как следствие, вызывает нарушение кровотока в почках, что приводит к патологическим изменениям нефрона. Для оценки выделительной функции почек исследовали концентрацию креатинина и мочевины в крови.

**Креатинин**– низкомолекулярное вещество, синтезируемое в мышцах, конечный продукт креатин-фосфатной реакции, выводится из организма почками. Повышенное содержание этого метаболита в крови свидетельствует о функциональном нарушении почек.

При развитии сахарного диабета на 30 сутки уровень креатинина снизился по сравнению с интактной группой с 64,11±2,33 до 44,72±1,21 ммоль/л, на 60 сутки уровень креатинина оставался пониженным (45,89±3,12ммоль/л), что, возможно, связано с нарушением белкового обмена в органах и тканях.

**Мочевина** – низкомолекулярное вещество, конечный продукт обмена аминокислот в организме.Определение концентрации этого метаболита позволяет оценивать эффективность работы почек. Повышение уровня мочевины в плазме крови является показателем развития почечной недостаточности.

При развитии сахарного диабета на 30 сутки уровень мочевины в плазме крови повысился по сравнению с интактной группой с 5,09±0,30 до 6,80±0,58ммоль/л, но не выходил за рамки референсных значений. На 60 сутки содержание мочевины снизилось до 5,4±0,3 ммоль/л, достигнув уровня интактной группы.

Таким образом, биохимические показатели определили сохранность функционального состояния почек при СД2 типа (Таблица 10).

#### 5.4 Изменение гематологических показателей крови при развитии сахарного диабета 2 типа

Для оценки состояния организма в условиях развития СД2 типа были изучены изменения, происходящие в периферической крови, которые определяли на 30 и 60 сутки течения заболевания.

На 30 сутки развития СД2 гематокритный показатель, концентрация эритроцитов, их средний объем и ширина распределения по объему оставались на уровне исходных величин. Содержание гемоглобина в крови увеличилось со 140,7±0,2г/л в исходе до 147,4±0,3г/л в эксперименте, поэтому содержание гемоглобина в эритроцитах также увеличилось по сравнению с интактной группой с 16,1±0,2 до 17,86±0,3пг, а средняя его концентрация не изменилась.

Содержание лейкоцитов в течение первых 30 суток заболевания возросло с 10,76±0,79Г/л у интактных животных до 18,48±1,23Г/л, а к 60 суткам снизилось до 15,68±1,0Г/л. Увеличение количества лейкоцитов происходило за счет возрастания фракции лимфоцитов и средних клеток(MID): количество первых повысилось с 4,43±0,50Г/л до 11,81±0,94Г/л, а вторых с 0,6±0,17Г/л до 2,04±0,14Г/л. В этот период исследования отмечалось уменьшение содержания гранулоцитов с 5,81±0,85Г/л до 4,07±0,4Г/л.

При увеличении срока эксперимента параметры красной и белой крови соответствовали предыдущему сроку исследований.

Количество тромбоцитов и тромбоцитарные индексы оставались в пределах одного уровня на протяжении всего наблюдаемого периода.

#### 5.5 Заключение к разделу

С развитием сахарного диабета 2 типа количество островков Лангерганса сохранялось на протяжении всего исследуемого периода. Однако в морфологической структуре островков были выявлены патологические изменения, проявляющиеся в виде интерстициального отека анизоцитоза и анизонуклеоза, которые нарастали к 60 суткам течения диабета и свидетельствовали о развитии воспалительных процессов. Содержание клеток в островках не изменялось на протяжении всего эксперимента, но при этом количество бета-клеток снижалось, а их пролиферативная активность возрастала. Уменьшалась также оптическая плотность бета-клеток, что сопровождалось снижением концентрации инсулина и увеличением содержания глюкозы в плазме крови. Эти показатели оставались стабильными на протяжении всего срока наблюдения.

На фоне умеренной гипергликемии и гипоинсулинемии отмечались изменения в органах-мишенях сахарного диабета. Повышение активности АЛТ, наблюдавшееся в плазме крови на 30 сутки заболевания, свидетельствовало о нарушении проницаемости мембран гепатоцитов, при этом белоксинтезирующая функция печени сохранялась, так как показатель общего белка в крови не изменялся. Снижение активности АЛТ в плазме крови, наблюдавшееся к концу исследуемого периода, дало основание предположить развитие компенсаторных регенераторных процессов в гепатоцитах. Повышение уровня мочевины в плазме крови на 30 сутки заболевания, которое не выходило за пределы референсных значений, свидетельствовало о том, что нарушений в функционировании почек в процессе развития СД2 не наблюдалось.

У животных на протяжении всего наблюдаемого периода развития СД 2 был снижен уровень креатинина в плазме крови, что, возможно, связано с нарушением белкового обмена в тканях.

Увеличение содержания лейкоцитов и лимфоцитов в плазме крови свидетельствовало о развивающихся при СД 2 нарушениях в организме.

# Глава 6. Оценка регенераторных показателей островков Лангерганса при модуляции функциональной активности макрофагов

## 6.1 Оценка структуры островков Лангерганса при модуляции функциональной активности макрофагов здоровых животных.

Изменение активности макрофагов у здоровых крыс позволяет оценить их влияние на функциональное состояние поджелудочной железы, печени и почек, а также на показатели периферической крови.

После введения АФГ здоровым крысам структура ткани поджелудочной железы соответствовала гистологической норме. Отличий от структуры поджелудочной железы интактных животных обнаружено не было. В обеих группах отсутствовал интерстициальный отек стромы и панкреатических островков, не наблюдалось нарушений микроциркуляторного русла, полярности клеток; границы между ацинарными клетками были четкие, ядра одинакового размера, расположены в базальной части.

### 6.1.1 Оценка функциональной активности β-клеток при модуляции макрофагов

Исследования показали, что при введении АФГ морфометрические показатели поджелудочной железы крыс (количество панкреатических островков, их площадь, содержание в них клеток, а также абсолютное и относительное количество β-клеток в островках и их оптическая плотность) не изменились по сравнению с интактной группой (Таблица 3). Содержание инсулина и кортикостерона в плазме крови также не отличалось от интактной группы (Таблица 3).

Таблица 3. Морфометрические показатели в поджелудочной железе крыс на фоне модуляции макрофагов.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Показатель | Интактная группа | АФГ |
| Количество ПО на мм2 среза, шт. | 1,95±0,2 | 1,87±0,2 |
| Средняя площадь ПО, мкм2 | 8073±9532 | 11175,2±15751 |
| Количество клеток на мм2ПО | 8914±836 | 9457±502 |
| Количество β-клеток на мм2 ПО, шт. | 6944±457 | 6974±356 |
| % β-клеток от всех клеток ПО | 77,65±0,88 | 73,8±1,9 |
| ОП инсулина в ПО, условные единицы. | 1,23±0,34 | 1,25±0,06 |

1 - различия с показателем группы интактных животных достоверны при P<0,05

2 - различия с показателем группы АФГ достоверны при P<0,05

### 6.1.2 Оценка пролиферации β-клеток при модуляции функциональной активности макрофагов

У здоровых крыс при введении АФГ количество делящихся β-клеток не соответствовало показателям интактной группы **(**32,3±4,8 клеток/мм2). (Таблица 4).

Таблица 4. Пролиферативная активность β-клеток на фоне модуляции макрофагов

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Показатель | Интактная группа | АФГ |
| Количество Ki-67+ β-клеток, на мм2 ПО | 48,3±6,3 | 32,3±4,8 |

## 6.2 Изменение биохимических показателей крови при модуляции функциональной активности макрофагов

После введения АФГ концентрация глюкозы в плазме крови крыс составляла 6,52±0,28 ммоль/л и не отличалась от значения группы интактных животных **(**5,99± 0,17ммоль/л). (Таблица 5).

Таким образом, АФГ не оказывает повреждающего действия на структуру островкового аппарата поджелудочной железы, что подтверждается нормальным уровнем глюкозы в плазме крови у животных этой группы.

### 6.2.1 Исследование функциональных показателей поджелудочной железы

Активность альфа-амилазы в крови крыс после введения АФГ не отличалась от показателя интактной группы (29,75±2,93 и 31,56±1,4 мг/с\*л, соответственно), что говорит о сохранности функций экзокринной части поджелудочной железы (Таблица 5).

### 6.2.2 Исследование функциональных показателей печени

В группе животных на фоне введения АФГ активность АЛТ в крови была немного ниже, чем у интактной группы (11,54±0,76мкмоль/мин\*л и 12,93±0,88мкмоль/мин\*л, соответствено), а коэффициент де Ритиса, немного выше (1,45±0,04 и 1,29±0,06). Активность АСТ, щелочных фосфатаз и содержание общего белка в плазме крови на фоне введения АФГ не отличались от показателей интактной группы (Таблица 5).

### 6.2.3 Исследование функциональных показателей почек

После введения АФГ крысам уровни к**реатинина и мочевины** в плазме крови составляли 52,45±2,43 ммоль/л и 6,96±0,27 ммоль/л, соответственно. Эти показатели не отличались от значений интактной группы (64,11±2,33 ммоль/л и 5,09±0,3 ммоль/л, соответственно), что подтверждает отсутствие повреждающего действия АФГ на почки (Таблица 5).

Таблица 5. Биохимические показатели крови крыс на фоне модуляции функциональной активности макрофагов

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Показатель** | **Интактная группа** | **АФГ** |
| Глюкоза, ммоль/л | 5,99±0,17 | 6,52±0,28 |
| Гликозилированный гемоглобин, % | 4,33±0,282 | 3,3±0,41 |
| Альфа-амилаза, мг/с\*л | 29,75±2,93 | 31,56± 1,4 |
| АСТ/АЛТ | 1,29±0,062 | 1,45±0,041 |
| АЛТ, мкмоль/мин\*л | 12,93±0,882 | 11,54±0,761 |
| АСТ, мкмоль/мин\*л | 16,46±0,96 | 16,62± 0,92 |
| Щелочная фосфатаза, мкмоль/мин\*л | 69,66±3,86 | 67,48±2,65 |
| Общий белок, г/л | 72,00±2,68 | 69,18±3,4 |
| Креатинин, ммоль/л | 64,11±2,33 | 60,8±3,24 |
| Мочевина, ммоль/л | 5,09±0,30 | 5,4± 0,43 |

1 - различия с показателем группы интактных животных достоверны при P<0,05

2 - различия с показателем группы АФГ достоверны при P<0,05

## 6.3 Изменение гематологических показателей крови при модуляции функциональной активности макрофагов

При введении АФГ здоровым животным гематокритный показатель, концентрация эритроцитов в крови, их средний объем, ширина распределения по объему и содержание гемоглобина в эритроцитах не отличались от значений интактной группы. Однако, содержание гемоглобина в крови превышало показатель интактной группы (146±0,3г/л и 140,7±0,2г/л, соответственно) и концентрация гемоглобина в эритроцитах также была выше (36,3±0,42г/дл и 34,5±0,4г/дл, соответственно). (Таблица 6).

Содержание лейкоцитов составило 7,5±0,33 Г/л, что оказалось ниже показателя интактной группы (10,76±0,79Г/л). Снижение количества лейкоцитов происходило за счет уменьшения концентрации гранулоцитов (2,88±0,8 Г/л). Количество лимфоцитов и средних клеток не отличалось от показателя интактной группы. (Таблица 6)

На фоне введения АФГ количество тромбоцитов и ширина распределения их по объему оказались выше, чем у интактной группы (Таблица 6).

Таким образом, можно сделать вывод, что введение АФГ здоровым животным способствует повышению уровня гемоглобина в плазме крови, увеличению содержания тромбоцитов и снижению концентрации лейкоцитарной фракции за счет уменьшения количества гранулоцитов.

Таблица 6. Гематологические показатели крови крыс и на фоне введения АФГ.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Показатель** | **Интактная группа** | **АФГ** |
| Эритроциты, Т/л | 8,78±0,09 | 8,31± 0,23 |
| Гемоглобин, г/л | 140,7±0,22 | 146±0,291 |
| Гематокрит, % | 41,17±0,6 | 40,16 ±0,32 |
| MCV, фл | 46,74±1,3 | 48,3± 1,02 |
| MCH, пг | 16,1±0,2 | 16,9±0,7 |
| MCHC, г/дл | 34,5±0,42 | 36,3± 0,421 |
| RDW,% | 16,3± 0,1 | 16, 58± 0,15 |
| Лейкоциты, Г/л | 10,76±0,792 | 7,5±0,331 |
| Лимфоциты, Г/л | 4,43±0,50 | 4,08±0,61 |
| Лимфоциты, % | 39,1±1,72 | 55,8±2,331 |
| Гранулоциты, Г/л | 5,81±0,852 | 2,88±0,81 |
| Гранулоциты, % | 55,7±3,72 | 37,8±2,181 |
| Средние клетки (MID), Г/л | 0,6±0,17, | 0,54±0,17, |
| Средние клетки (MID), % | 2,9±0,342 | 6,4±1,211 |
| Тромбоциты, Г/л | 666,1±32,12 | 811,4±20,31 |
| Pct, % | 0,45 ± 0,02 | 0,51±0,01 |
| MPV, фл | 6,7±0,07 | 6,22±0,07 |
| PDW, % | 11,04±0,12 | 10,56±0,121 |

1 - различия с показателем группы интактных животных достоверны при P<0,05

2 - различия с показателем группы АФГ достоверны при P<0,05

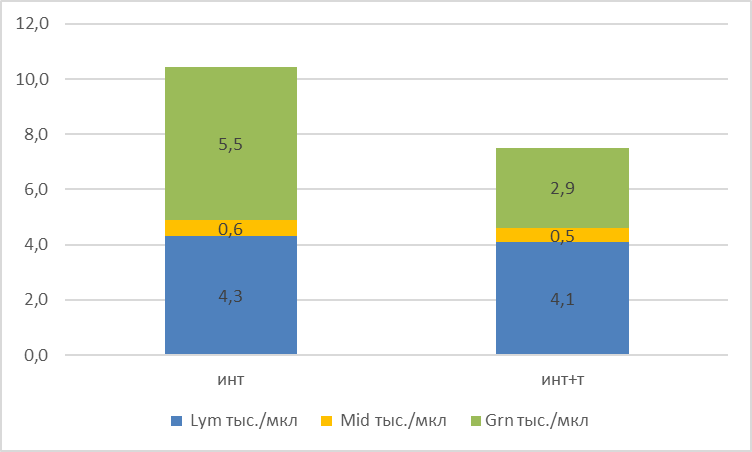


Рисунок 6. Гематологические показатели крови крыс и на фоне введения АФГ

## 6.4 Заключение к разделу

При введении АФГ здоровым животным морфофункциональных изменений в ткани поджелудочной железы обнаружено не было. Все исследуемые параметры, такие, как структура эндокринной и экзокринной части поджелудочной железы, количество островков, их площадь, содержание в них клеток, относительное и абсолютное количество бета-клеток и их оптическая плотность соответствовали показателям интактной группы животных. Концентрация инсулина и глюкозы в плазме крови также оставались на уровне интактной группы.

Биохимические тесты не выявили каких-либо изменений в функциональном состоянии поджелудочной железы, печени и почек. Однако, было обнаружено, что АФГ способствует повышению уровня гемоглобина в плазме крови, увеличению содержания тромбоцитов и снижению концентрации лейкоцитарной фракции за счет уменьшения количества гранулоцитов в плазме крови.

## 6.5 Оценка регенераторных показателей островков Лангерганса при модуляции функциональной активности макрофагов на фоне развития сахарного диабета 2 типа

В экзокринной части поджелудочной железы в группе животных с сахарным диабетом 30 суток на фоне воздействия АФГ обнаруживалось очаговое нарушение со стороны микроциркуляторного русла в виде полнокровия и образования сладж-комплексов в части трабекулярных сосудов, сохранялся умеренно выраженный интерстициальный отек. Дистрофических изменений ацинарных клеток обнаружено не было, они сохраняли полярность, отражающую нормальный секреторный цикл клетки.

В панкреатическом островке сохранялся умеренно выраженный интерстициальный отек, полнокровия и сладж-комплексов в капиллярных петлях обнаружено не было, в небольшом количестве определялись клетки с гипертрофированными ядрами, что указывает на их повышенную секреторную активность (рис. 7).

Таким образом, при введении АФГ уменьшались патологические изменения, как в экзокринной, так и в эндокринной части поджелудочной железы.

Полнокровие сосудов и сладж-комплексы

Гипертрофированные ядра

Умеренно выраженный интерстициальный отек

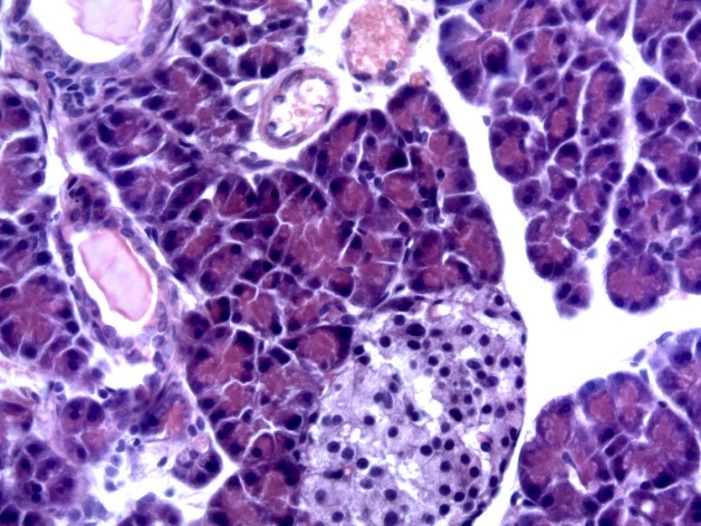


Рисунок 7. Экзокринная часть и панкреатический островок, окр. Гематоксилином и эозином, ув. Х 400

### 6.5.1 Оценка функциональной активности β-клеток при модуляции активности макрофагов на фоне развития сахарного диабета 2 типа

При модуляции макрофагов на фоне СД2 количество панкреатических островков, их площадь и содержание в них клеток не изменились по сравнению с интактной и экспериментальными группами животных. На 30 сутки количество β-клеток в островках Лангерганса составляло 42,34±7,92%, что было в 2 раза ниже, чем у интактной группы животных. При введении АФГ количество β-клеток в среднем по островку к концу наблюдаемого периода (60 суток) было выше, чем у животных, которым не вводили АФГ (55,71±2,53% и 35,15±11,91%, соответственно) и составило 71% от содержания β-клеток в островках интактных животных. Однако, при пересчете β-клеток на мм2 островка их содержание достигло показателя интактной группы (6753,06±220 шт.). Возрастание количества β-клеток при введении АФГ сопровождалось увеличением их оптической плотности до 1,36± 0,4усл. ед., что соответствовало увеличению концентрации инсулина в плазме крови (Таблица 7, 8).

Таким образом, увеличение массы и оптической плотности β-клеток, и, как следствие, увеличение концентрации инсулина и снижение уровня глюкозы в плазме крови можно объяснить активизацией регенераторных процессов в панкреатических островков при воздействии на систему мононуклеаров.

Таблица 7. Морфометрические показатели в поджелудочной железе животных при сахарном диабете 2 типа и на фоне модуляции макрофагов.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Показатель | Интактнаягруппа | СД2 30 суток | СД260 суток | СД2 +АФГ |
| Количество ПО на мм2 среза, шт. | 1,95±0,2 | 1,90±0,4 | 1,61±0,4 | 2,51±0,5 |
| Средняя площадь ПО, мкм2 | 8073±953 | 9477±750 | 9587±608 | 7732,7±774 |
| Количество клеток на мм2ПО | 8914±836 | 10823±2131 | 12531±536 | 11645±1567 |
| Количество β-клеток на мм2 ПО, шт. | 6944±4572,3 | 4837±6421,4 | 4015±7111,4, | 6753,06±2202,3 |
| % β-клеток от всех клеток ПО | 77,65±0,882,3,4 | 42,34±7,921,4 | 35,15±11,911,4 | 55,71±2,531,2,3 |
| ОП инсулина в ПО, усл. ед. | 1,23±0,342,3 | 0,7±0,141,4 | 0,54± 0,171,4 | 1,36± 0,42,3 |

1 - различия с показателем группы интактных животных достоверны при P<0,05

2 - различия с показателем группы СД 30 достоверны при P<0,05

3 - различия с показателем группы СД 60 достоверны при P<0,05

4 - различия с показателем группы СД 30 + АФГ достоверны при P<0,05

ПО – панкреатический островок

ОП – оптическая плотность

Таблица 8. Концентрация инсулина и кортикостеронав плазме крови при сахарном диабете 2 типа и на фоне модуляции макрофагов

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Показатель | Интактная группа | АФГ | CД2 30 суток | СД2 60 суток | СД2 +АФГ |
| Концентрация инсулина в плазме крови, пкг/мл | 59,51±3,93,4,5 | 56,17±8,2 | 48,73±2,31 | 41,87±0,91 | 43,75±0,91 |
| Концентрация кортикостерона  в плазме крови, пкг/мл | 86,6±6,24 |  | 92,7±12,54 | 79,2±4,04 | 39,9±7,21 |

1 - различия с показателем группы интактных животных достоверны при P<0,05

2 - различия с показателем группы СД 30 достоверны при P<0,05

3 - различия с показателем группы СД 60 достоверны при P<0,05

4 - различия с показателем группы СД 30 + АФГ достоверны при P<0,05

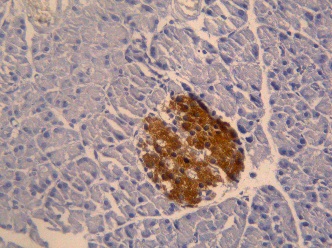
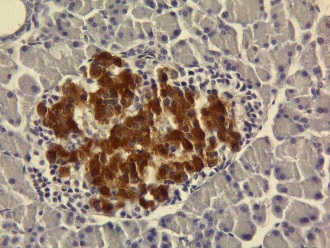
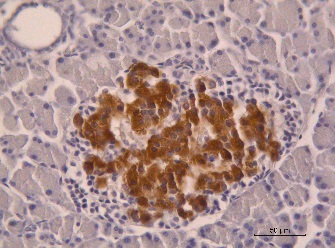
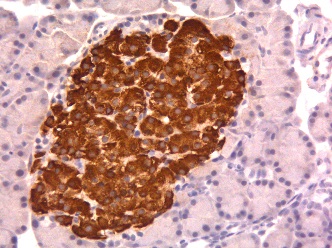


Рисунок 8. Содержание инсулинпродуцирующих клеток при введении АФГ на фоне СД2.

А. Интактная группа, Б. СД2 30 суток, В. СД2 60 суток, Г. СД2 +АФГ окраска на инсулин, ув. Х 400.

### 6.5.2 Оценка пролиферации β-клеток при модуляции функциональной активности макрофагов на фоне развития сахарного диабета 2 типа

При введении АФГ на фоне течения СД 2 пролиферативная активность бета-клеток снижалась.

Таблица 9. Пролиферативная активность β-клеток при сахарном диабете 2 типа и на фоне модуляции макрофагов

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Показатель | Интактная группа | CД230 суток | СД2 60 суток | СД2 +АФГ |
| Количество Ki-67+ β-клеток, на мм2 ПО | 48,3±6,3 | 69±13,2 | 107,7±16 | 93,3±11,4 |

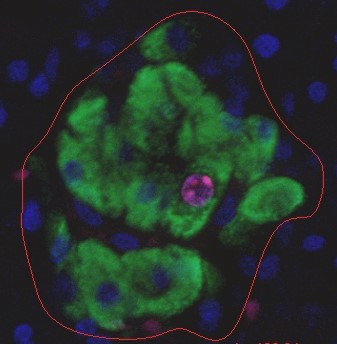
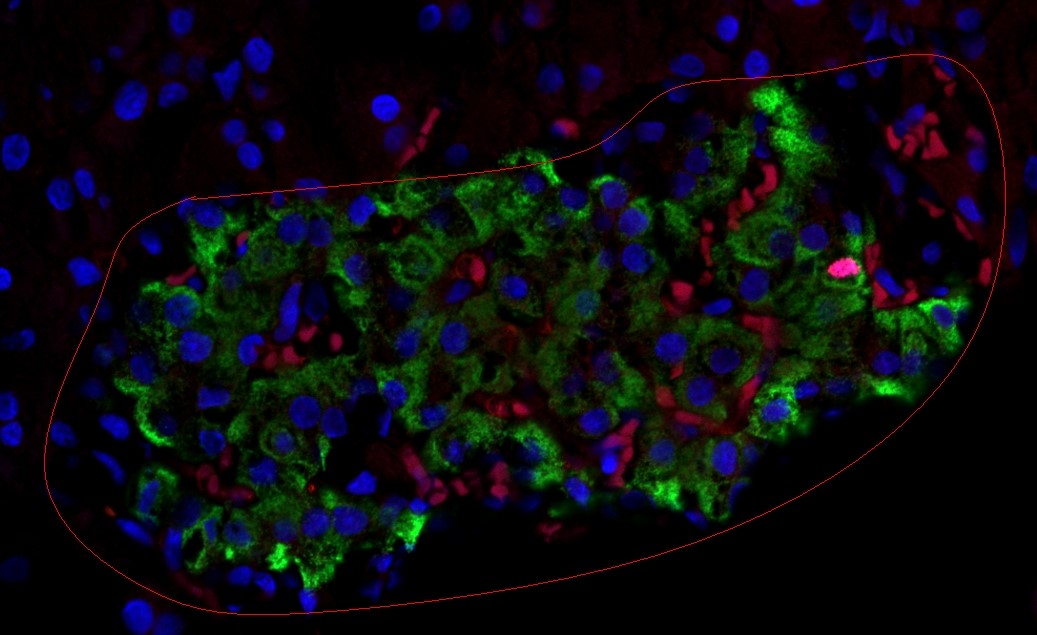
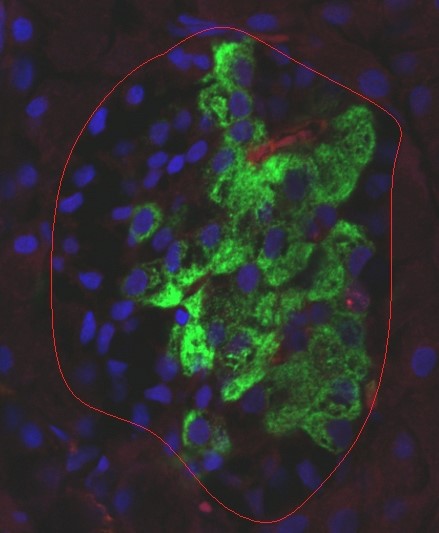
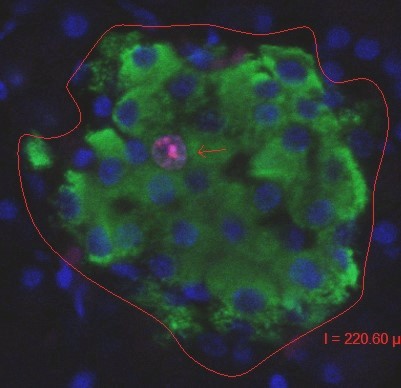


Рисунок 9. Пролиферативная активность инсулинсинтезирующих клеток. Конфокальный микроскоп, окраска антителами на инсулин и Ki-67, ув. Х 400

## 6.6 Изменение биохимических показателей крови при модуляции функциональной активности макрофагов на фоне развития сахарного диабета 2 типа

После введения АФГ на фоне СД2 наблюдалось снижение уровня глюкозы в плазме крови с 12,11±1,03 ммоль/л до 8,53±1,44 ммоль/л к концу исследуемого периода. Несмотря на снижение, этот показатель не достиг уровня интактных животных (5,99±0,17ммоль/л). В группе животных без введения АФГ на 60 сутки содержание глюкозы оставалось повышенным (12,23±0,5ммоль/л). (Таблица 10). Таким образом, снижение концентрации глюкозы в плазме крови происходило на фоне увеличения бета-клеточной массы в панкреатических островках и повышения уровня инсулина в крови.

### 6.6.1 Исследование функциональных показателей поджелудочной железы

Несмотря на нарушения в микроциркуляторном русле и сохранение умеренно выраженного интерстициального отека в экзокринной части поджелудочной железы на фоне введения АФГ при СД2 типа, наблюдаемые при гистологическом исследовании, уровень активности альфа-амилазы в крови снизился до показателя интактной группы (26,97±1,28мкмоль/мин\*л). Это было обусловлено отсутствием дистрофических изменений и сохранением полярности ацинарных клеток, что отражает их нормальный секреторный цикл. Полученные данные свидетельствуют о восстановлении структуры и функций ацинарных клеток поджелудочной железы при модуляции активности макрофагов.

### 6.6.2 Исследование функциональных показателей печени

На фоне модуляции активности макрофагов при СД2 наблюдалось снижение активности АЛТ в крови и увеличение коэффициента де Ритиса (11,37±0,58мкмоль/мин\*л и 1,46±0,06, соответственно); в группе животных, которым не вводили АФГ, активность АЛТ снизилась только до 17,17±1,47 мкмоль/мин\*л, а коэффициент де Ритиса составил 1,15±0,16; активность АСТ оставалась стабильной во всех экспериментальных группах.(Таблица 10). Активность щелочных фосфатази содержание общего белка в плазме крови на фоне введения АФГ не отличались от показателей всех экспериментальных групп.

Таким образом, модуляция функциональной активности макрофагов, возможно, опосредованно через снижение концентрации глюкозы в плазме крови и ослабления ее повреждающего действия на печень, способствует восстановлению ее функционального состояния.

### 6.6.3 Исследование функциональных показателей почек

При модуляции активности макрофагов на фоне СД2 уровень к**реатинина** в плазме крови повысился **с** 44,72±1,21ммоль/л у животных с СД2 продолжительностью 30 суток до 52,45±2,4ммоль/л, но не достиг значенияинтактной группы (64,11±2,33ммоль/л). При развитии СД2 типа до 60 суток без лечения уровень креатинина оставался пониженным (45,89±3,12ммоль/л). Возможно, это связано с нормализацией белкового обмена в органах и тканях при воздействии АФГ.

Концентрация мочевины к концу исследуемого периода оставалась на уровне 30 суток развития заболевания (6,96±0,27ммоль/л), не выходя за рамки референсных значений. (Таблица 10)

Таблица 10. Биохимические показатели крови при развитии сахарного диабета 2 типа и на фоне модуляции функциональной активности макрофагов

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Показатель** | **Интактная группа** | **СД 2 30 суток** | **СД 2 60 суток** | **СД + АФГ** |
| Глюкоза, ммоль/л | 5,99±0,172,3,4 | 12,11±1,031,4 | 12,23±0,51,4 | 8,53±1,441,2,3 |
| Гликозилированный гемоглобин, % | 4,33±0,28 | 5,00±0,72 | 4,52±0,60 | 4,83±0,60 |
| Альфа-амилаза, мг/с\*л | 29,75±2,932,3 | 44,38±2,571,4 | 40,68±3,321,4 | 26,97±1,282,3 |
| АСТ/АЛТ | 1,29±0,06 2,3,4, | 0,73±0,071,3,4 | 1,15±0,161,2,4, | 1,46±0,061,2,3 |
| АЛТ, мкмоль/мин\*л | 12,93±0,882,3,4, | 23,06±1,481,3,4 | 17,17±1,471,2,4 | 11,37±0,581,2,3 |
| АСТ, мкмоль/мин\*л | 16,46±0,96 | 16,44±0,79 | 18,52±1,52 | 16,60±1,11 |
| Щелочная фосфатаза, мкмоль/мин\*л | 69,66±3,86 | 65,5±9,6 | 78,52±10,34 | 61,07±4,15 |
| Общий белок, г/л | 72,00±2,68 | 68,58±3,75 | 69,84±3,32 | 64,30±4,08 |
| Креатинин, ммоль/л | 64,11±2,332,3,4 | 44,72±1,211,4 | 45,89±3,121,4 | 52,45±2,431,2,3 |
| Мочевина, ммоль/л | 5,09±0,302,4 | 6,80±0,581 | 5,4±0,34 | 6,96±0,271,3 |

1 - различия с показателем группы интактных животных достоверны при P<0,05

2 - различия с показателем группы СД 30 достоверны при P<0,05

3 - различия с показателем группы СД 60 достоверны при P<0,05

4 - различия с показателем группы СД 30 + АФГ достоверны при P<0,05

## 6.7 Изменение гематологических показателей крови при модуляции функциональной активности макрофагов на фоне развития сахарного диабета 2 типа

Для оценки изменений в организме при воздействии АФГ на систему мононуклеаров в условиях СД2 были исследованы те же показатели периферической крови, что и при развитии этого заболевания.

При введении АФГ на фоне СД2 гематокритный показатель, концентрация эритроцитов в крови, их средний объем, ширина распределения по объему и концентрация гемоглобина в эритроцитах не изменялись и оставались на уровне исходных величин. Концентрация гемоглобина в крови оставалась в пределах референсных значений, но еще более увеличилась по сравнению с остальными группами и достигла 171±1,1 г/л, тогда как содержание гемоглобина в эритроцитах оставалось на уровне обеих экспериментальных групп животных с сахарным диабетом. (Таблица 11).

Содержание лейкоцитов на фоне введения АФГ снизилось и составило 7,03±1,05 Г/л, что оказалось ниже показателя интактной группы. (10,76±0,79Г/л). Снижение количества лейкоцитов происходило за счет лимфоцитов, гранулоцитов и средних клеток. Количество лимфоцитов достигло значений интактной группы (3,47±0,5Г/л), а показатели гранулоцитов и средних клеток оказались ниже уровня интактных животных. (Таблица 11)

Количество тромбоцитов и тромбоцитарные индексы оставались в пределах одного уровня на протяжении всего наблюдаемого периода.

Таким образом, уменьшение лейкоцитарной фракции в плазме крови демонстрировало уменьшение системного воспаления.

Таблица 11. Гематологические показатели крови при развитии сахарного диабета 2 типа и на фоне введения АФГ.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Показатель** | **Интактная группа** | **СД 2 30 суток** | **СД 2 60 суток** | **СД + АФГ** |
| Эритроциты, Т/л | 8,78±0,09 | 8,5±0,2 | 9,0±0,4 | 9,16±0,6 |
| Гемоглобин, г/л | 140,7±0,22,3,4, | 147,4±0,31,4 | 146,0±0,31,4 | 171±1,12,3,1 |
| Гематокрит, % | 41,17±0,6 | 44,1±0,8 | 45,32±2,2 | 47±3,6 |
| MCV, фл | 46,74±1,3 | 52,2±0,7 | 50,3±0,48 | 50,73±0,85 |
| MCH, пг | 16,1±0,2 2,3,4 | 17,86±0,31 | 17,75±0,41 | 17,5±0,51 |
| MCHC, г/дл | 34,5±0,4 | 34,3±0,27 | 35,31±0,6 | 34,5±0,7 |
| RDW,% | 16,3± 0,1 | 15,8±0,17 | 16,2±0,21 | 16,03±0,26 |
| Лейкоциты, Г/л | 10,76±0,792,3,4, | 18,48±1,231,3,4 | 15,68±1,01,2,4 | 7,03±1,051,2,3 |
| Лимфоциты, Г/л | 4,43±0,502,3 | 11,81±0,941,4 | 10,43±1,531,4 | 3,47±0,52,3 |
| Лимфоциты, % | 39,1±1,72,3,4, | 66,89±1,851,4 | 66,33±1,421,4 | 54,00±4,582,31 |
| Гранулоциты, Г/л | 5,81±0,852,3,4, | 4,07±0,41,4 | 3,67±0,21 | 2,83±0,62,1 |
| Гранулоциты, % | 55,7±3,72,3,4, | 22,0±1,81,4 | 23,83±4,51,4 | 35,0±4,01,2,3 |
| Средние клетки (MID), Г/л | 0,6±0,172,3, | 2,04±0,141,4 | 1,8±0,271,4 | 0,77±0,222,3, |
| Средние клетки (MID), % | 2,9±0,34234 | 11,11±0,261 | 9,44±1,031 | 9,43±1,041 |
| Тромбоциты, Г/л | 666,1±32,1 | 627,8±12,1 | 667,6±15,6 | 675,6±46 |
| Pct, % | 0,45 ± 0,02 | 0,42±0,01 | 0,38±0,04 | 0,48±0,05 |
| MPV, фл | 6,7±0,07 | 6,7±0,1 | 6,47±0,07 | 6,37±0,12 |
| PDW, % | 11,04±0,1 | 11,4±0,15 | 11,44±0,07 | 11,2±0,2 |

1 - различия с показателем группы интактных животных достоверны при P<0,05

2 - различия с показателем группы СД 30 достоверны при P<0,05

3 - различия с показателем группы СД 60 достоверны при P<0,05

4 - различия с показателем группы СД 30 + АФГ достоверны при P<0,05

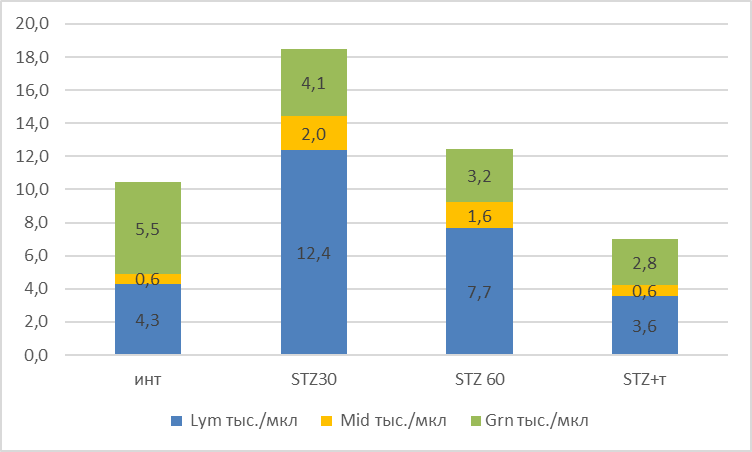


Рисунок 10. Гематологические показатели крови при развитии сахарного диабета 2 типа и на фоне введения АФГ.

## 6.8 Заключение к разделу

При модуляции функциональной активности макрофагов на фоне развития СД2 в структуре эндокринной части поджелудочной железы патологические изменения были менее выражены по сравнению с экспериментальными группами с СД2. В панкреатических островках на фоне сохранения общего числа клеток наблюдалось увеличение количества бета-клеток и их оптической плотности, вследствие чего в плазме крови повысился уровень инсулина и снизилась концентрация глюкозы.

На фоне снижения концентрации глюкозы в плазме крови и ослабления ее повреждающего действия на органы и ткани активность АЛТ в крови достигла нормальных значений, в связи с чем можно сделать вывод о восстановлении мембран гепатоцитов. Повышение уровня мочевины в плазме крови, характерное для 30 суток развития диабета наблюдалось и при модуляции макрофагов. Поскольку повышение этого показателя не выходило за пределы референсных значений, можно сделать вывод, что модуляция макрофагов не повлияла на функциональное состояние почек. Уровень креатинина в плазме крови достиг нормальных значений что, возможно, связано с нормализацией белкового обмена в тканях.

Кроме того, снижение содержания лейкоцитов в плазме крови свидетельствовало о снижении системного воспаления.

# Глава 7. Изучение функциональной активности макрофагов и оценка их количества в поджелудочной железе

Иммунная система не только осуществляет иммунологический надзор, но и регулирует физиологические функции организма. В частности, резидентные макрофаги панкреатического островка участвуют в поддержании его гомеостаза [112]. Эти макрофаги выделяют противовоспалительные цитокины, такие, как TGF-β, IL-10, которые изменяют внутриклеточную сигнализацию в макрофагах в сторону поляризации по противовоспалительному фенотипу, а также ингибируют секрецию провоспалительных цитокинов [4].

При определенных условиях макрофаги выделяют провоспалительные цитокины, такие, как TNF-alpha, IL-1 beta, IL-12, IL-6, что способствует экспрессии NO-синтазы, разрушению клеток NO-радикалами и развитию воспалительного процесса. Аккумуляция в поджелудочной железе макрофагов провоспалительного типа приводит к разрушению бета-клеток по такому же механизму [112, 133].

Для оценки функционального состояния макрофагов при развитии сахарного диабета 2 типа были исследованы поверхностные маркеры и цитокины, характеризующие фенотип макрофагов.

## 7.1 Оценка количества макрофагов в норме и при развитии сахарного диабета 2 типа

Аккумуляцию макрофагов в островках поджелудочной железы оценивали по молекуле CD68, которая экспрессируется на поверхности [моноцитов](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9C%D0%BE%D0%BD%D0%BE%D1%86%D0%B8%D1%82) и [макрофагов](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9C%D0%B0%D0%BA%D1%80%D0%BE%D1%84%D0%B0%D0%B3) и широко используется в качестве маркёра для этих клеток.

Иммуногистохимические исследования показали, что в панкреатических островках поджелудочной железы интактных животных количество CD68+  макрофагов составляло 21,2±8,5 клеток в пересчете на мм2 площади островка.

## 7.2 Оценка фенотипа макрофагов в поджелудочной железе в норме и при развитии сахарного диабета 2 типа

Фенотип макрофагов определяется экспрессией поверхностных молекул и секрецией цитокинов, которые зависят от микроокружения. Так, при развитии воспаления макрофаги экспрессируют на своей поверхности различные рецепторы, среди которых костимулирующие молекулы CD80 и 86, играющие важную роль в презентации антигена наивным Т-лимфоцитам. Определение этих молекул демонстрирует провоспалительную активацию макрофагов. Молекула CD163 экспрессируется на противовоспалительных макрофагах и является маркером фенотипа М2.

### 7.2.1 Изучение поверхностных маркеров макрофагов в норме и при развитии сахарного диабета 2 типа

### 7.2.2 Изучение цитокинового профиля макрофагов в норме и при развитии сахарного диабета 2 типа

Фенотип макрофагов характеризуется продукцией цитокинов. Так, макрофаги провоспалительного фенотипа секретируют большое количество IL-1β, IL-12, IL-6 и TNF-а. Противовоспалительный фенотип характеризуется сниженной продукцией провоспалительных цитокинов и усиленной продукцией анти-воспалительных цитокинов, таких, как IL-10, TGF-б.

Поскольку степень развития воспалительного процесса в поджелудочной железе влияет на реализацию регенераторных механизмов в органе, был определен уровень TNF-a в плазме крови, а также количество и локализация TGF-b позитивных клеток.

В динамике развития экспериментального сахарного диабета отмечается значительное увеличение уровня TNF-а в крови и в гомогенате поджелудочной железы, что свидетельствует о формировании воспалительного процесса.

В ходе иммуногистохимического исследования на содержание TGF-b в паренхиме поджелудочной железе было выявлено, что в условиях развития экспериментального сахарного диабета снижается количество TGF-b+ клеток в островковом аппарате.

## 7.3 Оценка количества макрофагов при модуляции их функциональной активности в норме и на фоне развития сахарного диабета 2 типа

АФГ является модулятором активности макрофагов и переключает их с провоспалительного фенотипа на противовоспалительный.

При введении АФГ здоровым животным количество CD68+ макрофагов не отличалось от показателя интактной группы: в панкреатических островках поджелудочной железы этой экспериментальной группы насчитывалось 23,6±7,2 клеток в пересчете на мм2 площади островка, а в интактной группе данный показатель составлял 21,2±8,5кл/мм2.

Таким образом, АФГ не способствует изменению количества макрофагов в поджелудочной железе животных.

## 7.4 Оценка фенотипа макрофагов в поджелудочной железе при модуляции их функциональной активности в норме и на фоне развития сахарного диабета 2 типа

### 7.4.1 Изучение поверхностных маркеров макрофагов при модуляции их функциональной активности в норме и на фоне развития сахарного диабета 2 типа

Таблица 12 Поверхностные маркеры макрофагов

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Показатель** | **Интактная группа** | **СД 2 30 суток** | **СД 2 60 суток** | **СД + АФГ** |
| **СD 68** | 21,2±8,5 |  |  |  |
| **F4/80** |  |  |  |  |
| **CD 163** | 15,77±1,74 | 24,13±5,55 | 32,97±6,14 | 33,81±4,92 |
| **СD 80** |  |  |  |  |

### 7.4.2 Изучение цитокинового профиля макрофагов при модуляции их функциональной активности в норме и на фоне развития сахарного диабета 2 типа

Модуляция функциональной активности макрофагов на фоне развития экспериментального сахарного диабета способствует снижению уровня TNF-a в гомогенате поджелудочной железы относительно показателя группы животных без лечения на 60-е сутки, однако в крови концентрация данного показателя сохраняется на уровне животных без лечения.

Таблица 13 Цитокиновый профиль макрофагов

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Показатель** | | **Интактная группа** | **АФГ** | **СД 2 30 суток** | **СД 2 60 суток** | **СД + АФГ** |
| TNF-a | Плазма | 16,14±3,1 |  | 4,76±1,9 | 7,69±2,7 | 9,10±2,9 |
| Гомогенат | 262,85±49,6 | 161,87±30,7 | 102,82±9,6 | 147,13±31,9 | 212,14±77,1 |
| TGF-b | Плазма | 270,75±21,3 |  | 149,40±18,9 | 126,72±10,1 | 186,70±25,9 |
| Гомогенат | 221,97±79,9 | 56,52±1,0 | 115,30±14,6 | 127,71±30,7 | 159,02±44,3 |
| IFN-g | Плазма | 133,53±12,1 |  | 730,95±229,4 | 752,69±155,0 | 126,02±8,5 |
| Гомогенат | 920,77±154,6 | 642,96±129,7 | 695,36±55,0 | 466,59±109,0 | 913,01±351,2 |
| IL-1 |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |

# Заключение

За последние десятилетия накоплено достаточное количество данных о том, что в регуляции неиммунных функций организма может принимать участие иммунная система. Влияние макрофагов на регенерацию органов открывает возможности для создания новых терапевтических подходов для лечения различных заболеваний, в том числе сахарного диабета 2 типа.

В данном исследовании использовалась стрептозотоцин-никотинамидная модель (СТЗ-НА) сахарного диабета 2 типа, которая характеризуется развитием умеренной гипергликемии, снижением толерантности к глюкозе, снижением продукции инсулина, отсутствием инсулинорезистентности и ожирения. Такое развитие сахарного диабета 2 типа характерно для стран Дальнего Востока [49].

Для верификации модели были определены концентрации глюкозы и инсулина в плазме крови экспериментальных животных, а также проведен тест толерантности к глюкозе. В результате этих исследований была выявлена умеренная гипергликемия на фоне умеренного снижения концентрации инсулина, скорость поглощения глюкозы клетками после пероральной нагрузки была снижена.

В динамике экспериментального сахарного диабета 2 типа подтвердились умеренная гипергликемия и гипоинсулинемия. Морфометрические исследования островкового аппарата поджелудочной железы установили уменьшение количества β-клеток на фоне сохранения общей клеточности островков. Оптическая плотность β-клеток, характеризующая их функциональное состояние уменьшалась, что сопровождалось снижением концентрации инсулина и увеличением содержания глюкозы в плазме крови натощак. Уменьшение количества бета-клеток и снижение функциональной активности сохранившихся бета-клеток можно объяснить нарушениями, развивающимися при сахарном диабете.

Выявленные нарушения островкового аппарата поджелудочной железы подтверждались биохимическими и гематологическими тестами. На фоне умеренной гипергликемии и гипоинсулинемии отмечались повреждения в органах-мишенях сахарного диабета. Повышение активности АЛТ, наблюдавшееся в плазме крови на 30 сутки эксперимента, свидетельствовало о нарушении проницаемости мембран гепатоцитов, при этом белоксинтезирующая функция печени сохранялась, так как показатель общего белка в крови не изменялся. Снижение активности АЛТ в плазме крови, наблюдавшееся к концу исследуемого периода, дало основание предположить развитие компенсаторных процессов в гепатоцитах. У животных на протяжении всего наблюдаемого периода развития СД 2 был снижен уровень креатинина в плазме крови, что, возможно, связано с нарушением белкового обмена в тканях. Увеличение содержания лейкоцитов и лимфоцитов в плазме крови свидетельствовало о развивающихся при СД 2 нарушениях в организме.

Кроме того, наблюдалось увеличение концентрации провоспалительного цитокина TNF-α в ткани поджелудочной железы. Как известно, этот цитокин секретируется в основном макрофагами М1 типа и повышается при повреждениях тканей, поэтому по его концентрации можно косвенно судить о функциональной активности макрофагов и их фенотипе. Увеличение уровня TNF-α можно объяснить увеличением функциональной активности макрофагов М1 фенотипа в поджелудочной железе при СД2.

При модуляции функциональной активности макрофагов производными аминофталгидрозидов на фоне развития СД2 в структуре эндокринной части поджелудочной железы патологические изменения были менее выражены по сравнению с экспериментальными группами с СД2. В панкреатических островках на фоне сохранения общего числа клеток наблюдалось увеличение количества β-клеток и оптической плотности инсулина, вследствие чего в плазме крови повысился уровень инсулина и снизилась концентрация глюкозы.

На фоне снижения концентрации глюкозы в плазме крови и ослабления ее повреждающего действия на органы и ткани активность АЛТ в крови достигла нормальных значений, в связи с чем можно сделать вывод о восстановлении мембран гепатоцитов. Уровень креатинина в плазме крови достиг нормальных значений что, возможно, связано с нормализацией белкового обмена в тканях. При этом, содержание лейкоцитов в крови понизилось до нормальных значений.

Кроме того, снижение концентрации TNF-α в ткани поджелудочной железы косвенно подтверждало увеличение функциональной активности макрофагов М2 фенотипа, которые ингибируют продукцию провоспалительных цитокинов.

Таким образом, можно заключить, что регенерация островкового аппарата поджелудочной железы при сахарном диабете 2 типа является макрофаг-зависимым процессом и способствует повышению уровня инсулина и снижению концентрации глюкозы в крови.

# Выводы

1. Функциональная активность макрофагов определяет стратегию регенераторных процессов островков Лангерганса, которая осуществляется, с одной стороны, увеличением количества β-клеток в островке, а с другой стороны в повышении их функциональной активности.
2. В динамике развития сахарного диабета 2 типа наблюдаются структурные повреждение островкового аппарата поджелудочной железы, проявляющиеся в уменьшении количества β-клеток и снижении их функциональной активности.
3. В динамике развития СД2 функциональная активность макрофагов направлена в сторону продукции провоспалительных цитокинов (TNF-α).
4. При модуляции активности макрофагов на фоне СД2 типа наблюдается увеличение содержания β-клеток в панкреатических островках и повышение их инсулинсинтезирующей функции, что приводит к увеличению концентрации инсулина и снижению уровня глюкозы в плазме крови.

# Список сокращений

СД1 – Сахарный диабет 1 типа

СД2 – Сахарный диабет 2 типа

TCR – Т-клеточный рецептор

IFN-γ – Интерферон гамма

TNF-α – Фактор некроза опухоли альфа

IL-1β – Интерлейкин -1 бета

iNOS – Индуцибельная синтаза оксида азота

NO – Оксид азота

Th – Т- хелпер

MHC II – Главный комплекс гистосовместимости 2 класса

TGF-β – Трансформирующий фактор бета

LPS - Липополисахарид

TLR – Толл- подобный рецептор

Arg-1 – Аргиназа-1

COX - Циклооксигеназа

IRS – Субстрат рецептора инсулина

СЖК – Свободные жирные кислоты

PAMP - Патоген- ассоциированные молекулярные шаблоны

ЛПНП – Липопротеины низкой плотности

NF-κB – Ядерный фактор каппа-Б

VEGF – Эндотелиальный фактор роста сосудов

# Список литературы

1. Б.Г.Юшков, М.Т.Абидов, И.Г.Данилова С.Ю.Медведева. Неиммунологические функции макрофагов. 2011. 246 p.

2. Duque G.A., Descoteaux A. Macrophage cytokines: Involvement in immunity and infectious diseases // Front. Immunol. 2014. Vol. 5, № OCT. P. 1–12.

3. Geissmann F. et al. Development of monocytes, macrophages and dendritic cells // Science (80-. ). 2010. Vol. 327, № 5966. P. 656–661.

4. Wood W., Martin P. Macrophage Functions in Tissue Patterning and Disease: New Insights from the Fly // Dev. Cell. Elsevier Inc., 2017. Vol. 40, № 3. P. 221–233.

5. Elhelu M.A. The role of macrophages in immunology. // J. Natl. Med. Assoc. 1983. Vol. 75, № 3. P. 314–317.

6. Taylor P.R. et al. Macrophage Receptors and Immune Recognition // Annu. Rev. Immunol. 2005. Vol. 23, № 1. P. 901–944.

7. Meshkani R., Vakili S. Tissue resident macrophages: Key players in the pathogenesis of type 2 diabetes and its complications // Clinica Chimica Acta. Elsevier B.V., 2016. Vol. 462. 77-89 p.

8. Yang J. et al. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases // Biomark. Res. 2014. Vol. 2, № 1. P. 1.

9. Mantovani A. et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. 2004. Vol. 25, № 12.

10. Wang N., Liang H., Zen K. Molecular mechanisms that influence the macrophage M1-M2 polarization balance // Front. Immunol. 2014. Vol. 5, № NOV. P. 1–9.

11. Qian B.-Z.B., Pollard J.W. Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis // Cell. 2010. Vol. 141, № 1. P. 39–51.

12. Chávez-Galán L. et al. Much more than M1 and M2 macrophages, there are also CD169+ and TCR+ macrophages // Front. Immunol. 2015. Vol. 6, № MAY. P. 1–15.

13. Martinez F.O., Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment // F1000Prime Rep. 2014. Vol. 6, № March. P. 1–13.

14. Ryszer T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. 2015. Vol. 2015. P. 16–18.

15. Монастырская Е.А., Лямина С.В., Малышев И.Ю. М1 и М2 фенотипы активированных макрофагов и их роль в иммунном ответе и патологии // Патогенез. 2008. Vol. 6, № 4. P. 31–39.

16. MacMicking J., Xie Q., Nathan C. Nitric Oxide and Macrophage Function // Annu. Rev. Immunol. 1997. Vol. 15, № 1. P. 323–350.

17. Dembic Z. Cytokines Important for Growth and/or Development of Cells of the Immune System // Cytokines Immune Syst. 2015. P. 263–281.

18. Krausgruber T. et al. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses // Nat. Immunol. Nature Publishing Group, 2011. Vol. 12, № 3. P. 231–238.

19. Arnold C.E. et al. A critical role for suppressor of cytokine signalling 3 in promoting M1 macrophage activation and function in vitro and in vivo // Immunology. 2014. Vol. 141, № 1. P. 96–110.

20. Duluc D. et al. Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated-macrophage-like cells // Blood. 2007. Vol. 110, № 13. P. 4319–4331.

21. Thomas A. Wynn, Luke Barron, Robert W. Thompson, Satish K. Madala, Mark S. Wilson, Allen W. Cheever and T.R. Quantitative Assessment of Macrophage Functions in Repair and Fibrosis // Curr Protoc Immunol. 2011. Vol. 1. P. 1–15.

22. Orme J., Mohan C. Macrophage subpopulations in systemic lupus erythematosus. // Discov. Med. 2012. Vol. 13, № 69. P. 151–158.

23. Mirshafiey P.A. The role of Macrophage as APCs,Phagocytosis, and a source of ROS, as Potential Therapeutic and Preventive Target in Cancer and Autoimmunity. 2017. Vol. 8, № 9. P. 208–225.

24. Davis M.J. et al. Macrophage M1 / M2 Polarization Dynamically Adapts to Changes in // MBio. 2013. Vol. 4, № 3. P. 1–10.

25. Jablonski K.A. et al. Novel markers to delineate murine M1 and M2 macrophages // PLoS One. 2015. Vol. 10, № 12. P. 5–11.

26. Dembic Z. Cytokines of the Immune System // Cytokines Immune Syst. 2015. P. 241–262.

27. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины // Цитокины. Санкт Петербург: Фолиант, 2008. 552 p.

28. Sivangala R., Sumanlatha G. Cytokines that mediate and regulate immune responses // Innov. Immunol. 2015. P. 1–26.

29. Dembic Z. Cytokines of the Immune System // The Cytokines of the Immune System. 2015. 241-262 p.

30. Gatti S. et al. Effect of interleukin-18 on mouse core body temperature // Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol. 2002. Vol. 282, № 3. P. R702–R709.

31. Lee J.K. et al. Differences in signaling pathways by IL-1beta and IL-18 // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2004. Vol. 101, № 23. P. 8815–8820.

32. van der Poll T. et al. Interleukin‐6 Gene‐Deficient Mice Show Impaired Defense against Pneumococcal Pneumonia // J. Infect. Dis. 1997. Vol. 176, № 2. P. 439–444.

33. Pedersen B.K., Brandt C. The role of exercise-induced myokines in muscle homeostasis and the defense against chronic diseases // J. Biomed. Biotechnol. 2010. Vol. 2010.

34. Wang K.S., Frank D.A., Ritz J. Interleukin-2 enhances the response of natural killer cells to interleukin-12 through up-regulation of the interleukin-12 receptor and STAT4. // Blood. 2000. Vol. 95, № 10. P. 3183–3190.

35. Temblay J.N. et al. Production of IL-12 by Peyer patch-dendritic cells is critical for the resistance to food allergy // J. Allergy Clin. Immunol. 2007. Vol. 120, № 3. P. 659–665.

36. Duvallet E. et al. Interleukin-23: A key cytokine in inflammatory diseases // Ann. Med. 2011. Vol. 43, № 7. P. 503–511.

37. Olszewski M.B. et al. TNF Trafficking to Human Mast Cell Granules: Mature Chain-Dependent Endocytosis // J. Immunol. 2007. Vol. 178, № 9. P. 5701–5709.

38. Theiss A.L. et al. Tumor necrosis factor (TNF) α increases collagen accumulation and proliferation in intestinal myofibroblasts via TNF receptor 2 // J. Biol. Chem. 2005. Vol. 280, № 43. P. 36099–36109.

39. Fiorentino D.F. et al. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages // J Immunol. 1991. Vol. 147, № 11. P. 3815–3822.

40. CHADBAN et al. Interleukin-10 differentially modulates MHC class II expression by mesangial cells and macrophages in vitro and in vivo // Immunology. 2001. Vol. 94, № 1. P. 72–78.

41. Wipff P.J., Hinz B. Integrins and the activation of latent transforming growth factor ??1 - An intimate relationship // Eur. J. Cell Biol. 2008. Vol. 87, № 8–9. P. 601–615.

42. Rifkin D.B. Latent transforming growth factor-β (TGF-β) binding proteins: Orchestrators of TGF-β availability // J. Biol. Chem. 2005. Vol. 280, № 9. P. 7409–7412.

43. Li M.O. et al. Transforming Growth Factor-Β Regulation of Immune Responses // Annu. Rev. Immunol. 2006. Vol. 24, № 1. P. 99–146.

44. Eisenstein E.M., Williams C.B. The Treg/Th17 cell balance: A new paradigm for autoimmunity // Pediatr. Res. 2009. Vol. 65, № SUPPL. 5. P. 26–31.

45. Wu D. et al. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis // Science (80-. ). 2011. Vol. 332, № 6026. P. 243–247.

46. Малышев И.Ю. Феномены и сигнальные механизмы репрограммирования макрофагов // ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ. 2015. P. 99–111.

47. Vergadi E. et al. Akt Signaling Pathway in Macrophage Activation and M1/M2 Polarization // J. Immunol. 2017. Vol. 198, № 3. P. 1006–1014.

48. Sica A., Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: In vivo veritas // Journal of Clinical Investigation. 2012. Vol. 122, № 3. P. 787–795.

49. Islam M.S., Loots D.T. EXPERIMENTAL RODENT MODELS OF TYPE 2 DIABETES: A REVIEW // Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol. 2009. Vol. 31. P. 249–261 ST–EXPERIMENTAL RODENT MODELS OF TYPE 2.

50. Malozowski S., Sahlroot J.T. Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. // N. Engl. J. Med. 2007. Vol. 357, № 3. P. 302–303; author reply 303.

51. Kahn S., Hull R., Utzschneider K. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes.

52. Shoelson S.E., Lee J., Goldfine A.B. Inflammation and insulin resistance // J. Clin. Invest. 2006. Vol. 116, № 7. P. 1793–1801.

53. Kraakman M.J. et al. Macrophage Polarization in Obesity and Type 2 Diabetes: Weighing Down Our Understanding of Macrophage Function? // Front. Immunol. 2014. Vol. 5, № September. P. 1–6.

54. Espinoza-Jiménez A., Peón A.N., Terrazas L.I. Alternatively activated macrophages in types 1 and 2 diabetes // Mediators of Inflammation. 2012. Vol. 2012.

55. Mandrup-Poulsen T. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of IDDM // Diabetologia. 1996. Vol. 39, № 9. P. 1005–1029.

56. Kulkarni R.N. et al. Altered function of insulin receptor substrate-1–deficient mouse islets and cultured β-cell lines // J. Clin. Invest. 1999. Vol. 104, № 12. P. R69–R75.

57. Hennige A.M. et al. Alterations in growth and apoptosis of insulin receptor substrate-1-deficient beta-cells. // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2005. Vol. 289, № 2. P. E337-46.

58. Watanabe H. et al. Aging is associated with decreased pancreatic acinar cell regeneration and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activation // Gastroenterology. 2005. Vol. 128, № 5. P. 1391–1404.

59. Araki E, Lipes MA, Patti ME, Brüning JC, Haag B 3rd, Johnson RS K.C. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. // Nature. 1994. Vol. 372, № 10. P. 186–190.

60. Hiroaki Watanabe, Hiroshi Saito, Junji Ueda and B.M.E. Regulation of Pancreatic Duct Cell Differentiation by Phosphatidylinositol-3 Kinase // Biochem Biophys Res Commun. 2008. Vol. 370, № 1. P. 33–37.

61. Butler A.E. et al. Beta-cell deficit and increased beta-Cell apoptosis in humans with type 2 diabetes // Diabetes. 2003. Vol. 52, № January. P. 102–110.

62. Kasuga M. Insulin resistance and pancreatic b cell failure // J. Clin. Invest. 2010. Vol. 116, № 7. P. 1756–1760.

63. Collombat P. et al. Specifying pancreatic endocrine cell fates // Mech. Dev. 2006. Vol. 123, № 7. P. 501–512.

64. Shih H.P., Wang A., Sander M. Pancreas Organogenesis: From Lineage Determination to Morphogenesis // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2013. Vol. 29, № 1. P. 81–105.

65. Desgraz R., Herrera P.L. Pancreatic neurogenin 3-expressing cells are unipotent islet precursors // Development. 2009. Vol. 136, № 21. P. 3567–3574.

66. Benitez C.M., Goodyer W.R., Kim S.K. Deconstructing pancreas developmental biology // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2012. Vol. 4, № 6. P. 1–17.

67. Johansson K.A. et al. Temporal Control of Neurogenin3 Activity in Pancreas Progenitors Reveals Competence Windows for the Generation of Different Endocrine Cell Types // Dev. Cell. 2007. Vol. 12, № 3. P. 457–465.

68. Brissova M. et al. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy // J. Histochem. Cytochem. 2005. Vol. 53, № 9. P. 1087–1097.

69. Magenheim J. et al. Ngn3+ endocrine progenitor cells control the fate and morphogenesis of pancreatic ductal epithelium // Dev. Biol. Elsevier Inc., 2011. Vol. 359, № 1. P. 26–36.

70. Sosa-Pineda B. et al. The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing β cells in the mammalian pancreas // Nature. 1997. Vol. 386, № 6623. P. 399–402.

71. Biller J.R. et al. pdx-1 function is specifically required in embryonic β cells to generate appropriate numbers of endocrine cell types and maintain glucose homeostasis // J. Magn. Reson. 2013. Vol. 236, № 2. P. 47–56.

72. Holland A.M. et al. Conditional Expression Demonstrates the Role of the Maintenance and Regeneration of {b}-Cells in the Adult // Diabetes. 2005. Vol. 54, № September. P. 2586–2595.

73. Daniella A. Babu1, Tye G. Deering1 and R.G.M. A Feat of Metabolic Proportions: Pdx1 Orchestrates Islet Development and Function in the Maintenance of Glucose Homeostasis // Mol Genet Metab. 2007. Vol. 92, № 1–2. P. 43–55.

74. 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. Vol. 277, № 15. P. 13286–13293.

75. Kushner J. a et al. Cyclins D2 and D1 Are Essential for Postnatal Pancreatic β -Cell Growth Cyclins D2 and D1 Are Essential for Postnatal Pancreatic ␤ -Cell Growth // Mol. Cell. Biol. 2005. Vol. 25, № 9. P. 3752–3762.

76. Unanue E.R. Macrophages in Endocrine Glands, with Emphasis on Pancreatic Islets // Microbiol. Spectr. 2016. Vol. 4, № 6. P. 1–11.

77. Vomund A.N. et al. Beta cells transfer vesicles containing insulin to phagocytes for presentation to T cells // Proc. Natl. Acad. Sci. 2015. Vol. 112, № 40. P. E5496–E5502.

78. James F. Mohan, Matteo G. Levisetti B.C. et al. In Autoimmune Diabetes Unique Autoreactive T Cells Recognize Insulin Peptides Generated in the Islets of Langerhans // Nat Immunol. 2010. Vol. 11, № 4. P. 350–354.

79. Byrd N. et al. Hedgehog is required for murine yolk sac angiogenesis. // Development. 2002. Vol. 129, № 2. P. 361–372.

80. Banaei-Bouchareb L., Valerie Gouon-Evans D.S.-B. Insulin cell mass is altered in Csf1 op/ Csf1 op macrophage-deficient mice // J. Leukoc. Biol. 2004. Vol. 76, № August. P. 359–367.

81. Geissmann E.G.P. and F. Development and maintainance of resident macrophages. 2016. Vol. 17, № 1. P. 2–8.

82. Tessem J.S. et al. Critical roles for macrophages in islet angiogenesis and maintenance during pancreatic degeneration. 2008. Vol. 57, № 6. P. 1605–1617.

83. Cockburn I.L., Ferris W.F. Pancreatic islet regeneration: Therapeutic potential, unknowns and controversy // S. Afr. J. Sci. 2015. Vol. 111, № 7–8. P. 1–5.

84. Rosenberg L., Brown R.A., Duguid W.P. A new approach to the induction of duct epithelial hyperplasia and nesidioblastosis by cellophane wrapping of the hamster pancreas // J. Surg. Res. 1983. Vol. 35, № 1. P. 63–72.

85. Ferris W.F. et al. Brief occlusion of the main pancreatic duct rapidly initiates signals which lead to increased duct cell proliferation in the rat // Cell Biol. Int. 2001. Vol. 25, № 1. P. 113–117.

86. Woodroof C.W. et al. Islet neogenesis is stimulated by brief occlusion of the main pancreatic duct // South African Med. J. 2004. Vol. 94, № 1. P. 54–57.

87. Brockenbrough J.S., Weir G.C., Bonner-Weir S. Discordance of exocrine and endocrine growth after 90% pancreatectomy in rats // Diabetes. 1988. Vol. 37, № 2. P. 232–236.

88. Bonner-Weir S. et al. A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas: A possible recapitulation of embryonic development // Diabetes. 1993. Vol. 42, № 12. P. 1715–1720.

89. Wang R.N. et al. Duct- to islet-cell differentiation and islet growth in the pancreas of duct-ligated adult rats // Diabetologia. 1995. № 38. P. 1405–1411.

90. Lardon J. et al. Exocrine cell transdifferentiation in dexamethasone-treated rat pancreas // Virchows Arch. 2004. Vol. 444, № 1. P. 61–65.

91. Mashima H. et al. Betacellulin and activin A coordinately convert amylase-secreting pancreatic AR42J cells into insulin-secreting cells // J. Clin. Invest. 1996. Vol. 97, № 7. P. 1647–1654.

92. Thorel F. et al. Conversion of adult pancreatic α-cells to Β-cells after extreme Β-cell loss // Nature. 2010. Vol. 464, № 7292. P. 1149–1154.

93. Mansouri A. Development and Regeneration in the Endocrine Pancreas // ISRN Endocrinol. 2012. Vol. 2012. P. 1–12.

94. Romer A.I., Sussel L. Pancreatic islet cell development and regeneration // Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes. 2015. Vol. 22, № 4. P. 255–264.

95. Thorel F. et al. Conversion of Adult Pancreatic α-cells to β-cells After Extreme β-cell Loss Fabrizio // October. 2010. Vol. 464, № 7292. P. 1149–1154.

96. Desai B.M. et al. Preexisting pancreatic acinar cells contribute to acinar cell, but not islet β cell, regeneration // Cell. 2007. Vol. 117, № 4. P. 971–977.

97. Solar M. et al. Pancreatic Exocrine Duct Cells Give Rise to Insulin-Producing β Cells during Embryogenesis but Not after Birth // Dev. Cell. 2009. Vol. 17, № 6. P. 849–860.

98. Xu X. et al. β Cells Can Be Generated from Endogenous Progenitors in Injured Adult Mouse Pancreas // Cell. 2008. Vol. 132, № 2. P. 197–207.

99. Zuba-Surma E.K. et al. Very small embryonic-like stem cells are present in adult murine organs: ImageStream-based morphological analysis and distribution studies // Cytom. Part A. 2008. Vol. 73, № 12. P. 1116–1127.

100. Bhartiya D. et al. Very small embryonic-like stem cells are involved in regeneration of mouse pancreas post-pancreatectomy // Stem Cell Res. Ther. 2014. Vol. 5, № 5. P. 1–12.

101. Banakh I. et al. Adult Pancreas Side Population Cells Expand after β Cell Injury and Are a Source of Insulin-Secreting Cells // PLoS One. 2012. Vol. 7, № 11.

102. Li W.-C. et al. Activation of pancreatic-duct-derived progenitor cells during pancreas regeneration in adult rats // J. Cell Sci. 2010. Vol. 123, № 16. P. 2792–2802.

103. Dor Y. et al. Adult pancreatic β-cell s are formed by self-duplication rather than ítem-cell differentiation // Nature. 2004. Vol. 429, № model 3. P. 41–46.

104. Bhushan A., Rizza R.A., Butler P.C. \_-Cell Replication Is the Primary Mechanism Subserving the Postnatal Expansion of \_-Cell Mass in Humans // Diabetes. 2013. Vol. 57, № 6. P. 1584–1594.

105. Hinault C. et al. Differential expression of cell cycle proteins during ageing of pancreatic islet cells // Diabetes, Obes. Metab. 2008. Vol. 10, № SUPPL. 4. P. 136–146.

106. Iglesias A. et al. Diabetes and exocrine pancreatic insufficiency in E2F1 / E2F2 double-mutant mice // J. Clin. Invest. 2004. Vol. 113, № 10. P. 1398–1407.

107. Bonner-Weir S. et al. β-cell growth and regeneration: Replication is only part of the story // Diabetes. 2010. Vol. 59, № 10. P. 2340–2348.

108. Sharma R. et al. Experimental Models on Diabetes : A Comprehensive Review // Int. J. Adv. Pharm. Sci. 2013. Vol. 4. P. 1–8.

109. Onofre G. et al. SCAVENGER RECEPTOR CD163 AND ITS BIOLOGICAL FUNCTIONS Molecular characterization // Acta Medica Cordoba. 2009. Vol. 52, № 26. P. 57–61.

1. Б.Г.Юшков, М.Т.Абидов, И.Г.Данилова С.Ю.Медведева. Неиммунологические функции макрофагов. 2011. 246 p.

2. Duque G.A., Descoteaux A. Macrophage cytokines: Involvement in immunity and infectious diseases // Front. Immunol. 2014. Vol. 5, № OCT. P. 1–12.

3. Geissmann F. et al. Development of monocytes, macrophages and dendritic cells // Science (80-. ). 2010. Vol. 327, № 5966. P. 656–661.

4. Wood W., Martin P. Macrophage Functions in Tissue Patterning and Disease: New Insights from the Fly // Dev. Cell. Elsevier Inc., 2017. Vol. 40, № 3. P. 221–233.

5. Elhelu M.A. The role of macrophages in immunology. // J. Natl. Med. Assoc. 1983. Vol. 75, № 3. P. 314–317.

6. Taylor P.R. et al. Macrophage Receptors and Immune Recognition // Annu. Rev. Immunol. 2005. Vol. 23, № 1. P. 901–944.

7. Meshkani R., Vakili S. Tissue resident macrophages: Key players in the pathogenesis of type 2 diabetes and its complications // Clinica Chimica Acta. Elsevier B.V., 2016. Vol. 462. 77-89 p.

8. Yang J. et al. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases // Biomark. Res. 2014. Vol. 2, № 1. P. 1.

9. Mantovani A. et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. 2004. Vol. 25, № 12.

10. Wang N., Liang H., Zen K. Molecular mechanisms that influence the macrophage M1-M2 polarization balance // Front. Immunol. 2014. Vol. 5, № NOV. P. 1–9.

11. Qian B.-Z.B., Pollard J.W. Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis // Cell. 2010. Vol. 141, № 1. P. 39–51.

12. Chávez-Galán L. et al. Much more than M1 and M2 macrophages, there are also CD169+ and TCR+ macrophages // Front. Immunol. 2015. Vol. 6, № MAY. P. 1–15.

13. Martinez F.O., Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment // F1000Prime Rep. 2014. Vol. 6, № March. P. 1–13.

14. Ryszer T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. 2015. Vol. 2015. P. 16–18.

15. Монастырская Е.А., Лямина С.В., Малышев И.Ю. М1 и М2 фенотипы активированных макрофагов и их роль в иммунном ответе и патологии // Патогенез. 2008. Vol. 6, № 4. P. 31–39.

16. MacMicking J., Xie Q., Nathan C. Nitric Oxide and Macrophage Function // Annu. Rev. Immunol. 1997. Vol. 15, № 1. P. 323–350.

17. Dembic Z. Cytokines Important for Growth and/or Development of Cells of the Immune System // Cytokines Immune Syst. 2015. P. 263–281.

18. Krausgruber T. et al. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses // Nat. Immunol. Nature Publishing Group, 2011. Vol. 12, № 3. P. 231–238.

19. Arnold C.E. et al. A critical role for suppressor of cytokine signalling 3 in promoting M1 macrophage activation and function in vitro and in vivo // Immunology. 2014. Vol. 141, № 1. P. 96–110.

20. Duluc D. et al. Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated-macrophage-like cells // Blood. 2007. Vol. 110, № 13. P. 4319–4331.

21. Thomas A. Wynn, Luke Barron, Robert W. Thompson, Satish K. Madala, Mark S. Wilson, Allen W. Cheever and T.R. Quantitative Assessment of Macrophage Functions in Repair and Fibrosis // Curr Protoc Immunol. 2011. Vol. 1. P. 1–15.

22. Orme J., Mohan C. Macrophage subpopulations in systemic lupus erythematosus. // Discov. Med. 2012. Vol. 13, № 69. P. 151–158.

23. Mirshafiey P.A. The role of Macrophage as APCs,Phagocytosis, and a source of ROS, as Potential Therapeutic and Preventive Target in Cancer and Autoimmunity. 2017. Vol. 8, № 9. P. 208–225.

24. Davis M.J. et al. Macrophage M1 / M2 Polarization Dynamically Adapts to Changes in // MBio. 2013. Vol. 4, № 3. P. 1–10.

25. Jablonski K.A. et al. Novel markers to delineate murine M1 and M2 macrophages // PLoS One. 2015. Vol. 10, № 12. P. 5–11.

26. Dembic Z. Cytokines of the Immune System // Cytokines Immune Syst. 2015. P. 241–262.

27. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины // Цитокины. Санкт Петербург: Фолиант, 2008. 552 p.

28. Sivangala R., Sumanlatha G. Cytokines that mediate and regulate immune responses // Innov. Immunol. 2015. P. 1–26.

29. Dembic Z. Cytokines of the Immune System // The Cytokines of the Immune System. 2015. 241-262 p.

30. Gatti S. et al. Effect of interleukin-18 on mouse core body temperature // Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol. 2002. Vol. 282, № 3. P. R702–R709.

31. Lee J.K. et al. Differences in signaling pathways by IL-1beta and IL-18 // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2004. Vol. 101, № 23. P. 8815–8820.

32. van der Poll T. et al. Interleukin‐6 Gene‐Deficient Mice Show Impaired Defense against Pneumococcal Pneumonia // J. Infect. Dis. 1997. Vol. 176, № 2. P. 439–444.

33. Pedersen B.K., Brandt C. The role of exercise-induced myokines in muscle homeostasis and the defense against chronic diseases // J. Biomed. Biotechnol. 2010. Vol. 2010.

34. Wang K.S., Frank D.A., Ritz J. Interleukin-2 enhances the response of natural killer cells to interleukin-12 through up-regulation of the interleukin-12 receptor and STAT4. // Blood. 2000. Vol. 95, № 10. P. 3183–3190.

35. Temblay J.N. et al. Production of IL-12 by Peyer patch-dendritic cells is critical for the resistance to food allergy // J. Allergy Clin. Immunol. 2007. Vol. 120, № 3. P. 659–665.

36. Duvallet E. et al. Interleukin-23: A key cytokine in inflammatory diseases // Ann. Med. 2011. Vol. 43, № 7. P. 503–511.

37. Olszewski M.B. et al. TNF Trafficking to Human Mast Cell Granules: Mature Chain-Dependent Endocytosis // J. Immunol. 2007. Vol. 178, № 9. P. 5701–5709.

38. Theiss A.L. et al. Tumor necrosis factor (TNF) α increases collagen accumulation and proliferation in intestinal myofibroblasts via TNF receptor 2 // J. Biol. Chem. 2005. Vol. 280, № 43. P. 36099–36109.

39. Fiorentino D.F. et al. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages // J Immunol. 1991. Vol. 147, № 11. P. 3815–3822.

40. CHADBAN et al. Interleukin-10 differentially modulates MHC class II expression by mesangial cells and macrophages in vitro and in vivo // Immunology. 2001. Vol. 94, № 1. P. 72–78.

41. Wipff P.J., Hinz B. Integrins and the activation of latent transforming growth factor ??1 - An intimate relationship // Eur. J. Cell Biol. 2008. Vol. 87, № 8–9. P. 601–615.

42. Rifkin D.B. Latent transforming growth factor-β (TGF-β) binding proteins: Orchestrators of TGF-β availability // J. Biol. Chem. 2005. Vol. 280, № 9. P. 7409–7412.

43. Li M.O. et al. Transforming Growth Factor-Β Regulation of Immune Responses // Annu. Rev. Immunol. 2006. Vol. 24, № 1. P. 99–146.

44. Eisenstein E.M., Williams C.B. The Treg/Th17 cell balance: A new paradigm for autoimmunity // Pediatr. Res. 2009. Vol. 65, № SUPPL. 5. P. 26–31.

45. Wu D. et al. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis // Science (80-. ). 2011. Vol. 332, № 6026. P. 243–247.

46. Малышев И.Ю. Феномены и сигнальные механизмы репрограммирования макрофагов // ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ. 2015. P. 99–111.

47. Vergadi E. et al. Akt Signaling Pathway in Macrophage Activation and M1/M2 Polarization // J. Immunol. 2017. Vol. 198, № 3. P. 1006–1014.

48. Sica A., Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: In vivo veritas // Journal of Clinical Investigation. 2012. Vol. 122, № 3. P. 787–795.

49. Islam M.S., Loots D.T. EXPERIMENTAL RODENT MODELS OF TYPE 2 DIABETES: A REVIEW // Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol. 2009. Vol. 31. P. 249–261 ST–EXPERIMENTAL RODENT MODELS OF TYPE 2.

50. Malozowski S., Sahlroot J.T. Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. // N. Engl. J. Med. 2007. Vol. 357, № 3. P. 302–303; author reply 303.

51. Kahn S., Hull R., Utzschneider K. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes.

52. Shoelson S.E., Lee J., Goldfine A.B. Inflammation and insulin resistance // J. Clin. Invest. 2006. Vol. 116, № 7. P. 1793–1801.

53. Kraakman M.J. et al. Macrophage Polarization in Obesity and Type 2 Diabetes: Weighing Down Our Understanding of Macrophage Function? // Front. Immunol. 2014. Vol. 5, № September. P. 1–6.

54. Espinoza-Jiménez A., Peón A.N., Terrazas L.I. Alternatively activated macrophages in types 1 and 2 diabetes // Mediators of Inflammation. 2012. Vol. 2012.

55. Mandrup-Poulsen T. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of IDDM // Diabetologia. 1996. Vol. 39, № 9. P. 1005–1029.

56. Kulkarni R.N. et al. Altered function of insulin receptor substrate-1–deficient mouse islets and cultured β-cell lines // J. Clin. Invest. 1999. Vol. 104, № 12. P. R69–R75.

57. Hennige A.M. et al. Alterations in growth and apoptosis of insulin receptor substrate-1-deficient beta-cells. // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2005. Vol. 289, № 2. P. E337-46.

58. Watanabe H. et al. Aging is associated with decreased pancreatic acinar cell regeneration and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activation // Gastroenterology. 2005. Vol. 128, № 5. P. 1391–1404.

59. Araki E, Lipes MA, Patti ME, Brüning JC, Haag B 3rd, Johnson RS K.C. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. // Nature. 1994. Vol. 372, № 10. P. 186–190.

60. Hiroaki Watanabe, Hiroshi Saito, Junji Ueda and B.M.E. Regulation of Pancreatic Duct Cell Differentiation by Phosphatidylinositol-3 Kinase // Biochem Biophys Res Commun. 2008. Vol. 370, № 1. P. 33–37.

61. Butler A.E. et al. Beta-cell deficit and increased beta-Cell apoptosis in humans with type 2 diabetes // Diabetes. 2003. Vol. 52, № January. P. 102–110.

62. Kasuga M. Insulin resistance and pancreatic b cell failure // J. Clin. Invest. 2010. Vol. 116, № 7. P. 1756–1760.

63. Collombat P. et al. Specifying pancreatic endocrine cell fates // Mech. Dev. 2006. Vol. 123, № 7. P. 501–512.

64. Shih H.P., Wang A., Sander M. Pancreas Organogenesis: From Lineage Determination to Morphogenesis // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2013. Vol. 29, № 1. P. 81–105.

65. Desgraz R., Herrera P.L. Pancreatic neurogenin 3-expressing cells are unipotent islet precursors // Development. 2009. Vol. 136, № 21. P. 3567–3574.

66. Benitez C.M., Goodyer W.R., Kim S.K. Deconstructing pancreas developmental biology // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2012. Vol. 4, № 6. P. 1–17.

67. Johansson K.A. et al. Temporal Control of Neurogenin3 Activity in Pancreas Progenitors Reveals Competence Windows for the Generation of Different Endocrine Cell Types // Dev. Cell. 2007. Vol. 12, № 3. P. 457–465.

68. Brissova M. et al. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy // J. Histochem. Cytochem. 2005. Vol. 53, № 9. P. 1087–1097.

69. Magenheim J. et al. Ngn3+ endocrine progenitor cells control the fate and morphogenesis of pancreatic ductal epithelium // Dev. Biol. Elsevier Inc., 2011. Vol. 359, № 1. P. 26–36.

70. Sosa-Pineda B. et al. The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing β cells in the mammalian pancreas // Nature. 1997. Vol. 386, № 6623. P. 399–402.

71. Biller J.R. et al. pdx-1 function is specifically required in embryonic β cells to generate appropriate numbers of endocrine cell types and maintain glucose homeostasis // J. Magn. Reson. 2013. Vol. 236, № 2. P. 47–56.

72. Holland A.M. et al. Conditional Expression Demonstrates the Role of the Maintenance and Regeneration of {b}-Cells in the Adult // Diabetes. 2005. Vol. 54, № September. P. 2586–2595.

73. Daniella A. Babu1, Tye G. Deering1 and R.G.M. A Feat of Metabolic Proportions: Pdx1 Orchestrates Islet Development and Function in the Maintenance of Glucose Homeostasis // Mol Genet Metab. 2007. Vol. 92, № 1–2. P. 43–55.

74. 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. Vol. 277, № 15. P. 13286–13293.

75. Kushner J. a et al. Cyclins D2 and D1 Are Essential for Postnatal Pancreatic β -Cell Growth Cyclins D2 and D1 Are Essential for Postnatal Pancreatic ␤ -Cell Growth // Mol. Cell. Biol. 2005. Vol. 25, № 9. P. 3752–3762.

76. Unanue E.R. Macrophages in Endocrine Glands, with Emphasis on Pancreatic Islets // Microbiol. Spectr. 2016. Vol. 4, № 6. P. 1–11.

77. Vomund A.N. et al. Beta cells transfer vesicles containing insulin to phagocytes for presentation to T cells // Proc. Natl. Acad. Sci. 2015. Vol. 112, № 40. P. E5496–E5502.

78. James F. Mohan, Matteo G. Levisetti B.C. et al. In Autoimmune Diabetes Unique Autoreactive T Cells Recognize Insulin Peptides Generated in the Islets of Langerhans // Nat Immunol. 2010. Vol. 11, № 4. P. 350–354.

79. Byrd N. et al. Hedgehog is required for murine yolk sac angiogenesis. // Development. 2002. Vol. 129, № 2. P. 361–372.

80. Banaei-Bouchareb L., Valerie Gouon-Evans D.S.-B. Insulin cell mass is altered in Csf1 op/ Csf1 op macrophage-deficient mice // J. Leukoc. Biol. 2004. Vol. 76, № August. P. 359–367.

81. Geissmann E.G.P. and F. Development and maintainance of resident macrophages. 2016. Vol. 17, № 1. P. 2–8.

82. Tessem J.S. et al. Critical roles for macrophages in islet angiogenesis and maintenance during pancreatic degeneration. 2008. Vol. 57, № 6. P. 1605–1617.

83. Cockburn I.L., Ferris W.F. Pancreatic islet regeneration: Therapeutic potential, unknowns and controversy // S. Afr. J. Sci. 2015. Vol. 111, № 7–8. P. 1–5.

84. Rosenberg L., Brown R.A., Duguid W.P. A new approach to the induction of duct epithelial hyperplasia and nesidioblastosis by cellophane wrapping of the hamster pancreas // J. Surg. Res. 1983. Vol. 35, № 1. P. 63–72.

85. Ferris W.F. et al. Brief occlusion of the main pancreatic duct rapidly initiates signals which lead to increased duct cell proliferation in the rat // Cell Biol. Int. 2001. Vol. 25, № 1. P. 113–117.

86. Woodroof C.W. et al. Islet neogenesis is stimulated by brief occlusion of the main pancreatic duct // South African Med. J. 2004. Vol. 94, № 1. P. 54–57.

87. Brockenbrough J.S., Weir G.C., Bonner-Weir S. Discordance of exocrine and endocrine growth after 90% pancreatectomy in rats // Diabetes. 1988. Vol. 37, № 2. P. 232–236.

88. Bonner-Weir S. et al. A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas: A possible recapitulation of embryonic development // Diabetes. 1993. Vol. 42, № 12. P. 1715–1720.

89. Wang R.N. et al. Duct- to islet-cell differentiation and islet growth in the pancreas of duct-ligated adult rats // Diabetologia. 1995. № 38. P. 1405–1411.

90. Lardon J. et al. Exocrine cell transdifferentiation in dexamethasone-treated rat pancreas // Virchows Arch. 2004. Vol. 444, № 1. P. 61–65.

91. Mashima H. et al. Betacellulin and activin A coordinately convert amylase-secreting pancreatic AR42J cells into insulin-secreting cells // J. Clin. Invest. 1996. Vol. 97, № 7. P. 1647–1654.

92. Thorel F. et al. Conversion of adult pancreatic α-cells to Β-cells after extreme Β-cell loss // Nature. 2010. Vol. 464, № 7292. P. 1149–1154.

93. Mansouri A. Development and Regeneration in the Endocrine Pancreas // ISRN Endocrinol. 2012. Vol. 2012. P. 1–12.

94. Romer A.I., Sussel L. Pancreatic islet cell development and regeneration // Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes. 2015. Vol. 22, № 4. P. 255–264.

95. Thorel F. et al. Conversion of Adult Pancreatic α-cells to β-cells After Extreme β-cell Loss Fabrizio // October. 2010. Vol. 464, № 7292. P. 1149–1154.

96. Desai B.M. et al. Preexisting pancreatic acinar cells contribute to acinar cell, but not islet β cell, regeneration // Cell. 2007. Vol. 117, № 4. P. 971–977.

97. Solar M. et al. Pancreatic Exocrine Duct Cells Give Rise to Insulin-Producing β Cells during Embryogenesis but Not after Birth // Dev. Cell. 2009. Vol. 17, № 6. P. 849–860.

98. Xu X. et al. β Cells Can Be Generated from Endogenous Progenitors in Injured Adult Mouse Pancreas // Cell. 2008. Vol. 132, № 2. P. 197–207.

99. Zuba-Surma E.K. et al. Very small embryonic-like stem cells are present in adult murine organs: ImageStream-based morphological analysis and distribution studies // Cytom. Part A. 2008. Vol. 73, № 12. P. 1116–1127.

100. Bhartiya D. et al. Very small embryonic-like stem cells are involved in regeneration of mouse pancreas post-pancreatectomy // Stem Cell Res. Ther. 2014. Vol. 5, № 5. P. 1–12.

101. Banakh I. et al. Adult Pancreas Side Population Cells Expand after β Cell Injury and Are a Source of Insulin-Secreting Cells // PLoS One. 2012. Vol. 7, № 11.

102. Li W.-C. et al. Activation of pancreatic-duct-derived progenitor cells during pancreas regeneration in adult rats // J. Cell Sci. 2010. Vol. 123, № 16. P. 2792–2802.

103. Dor Y. et al. Adult pancreatic β-cell s are formed by self-duplication rather than ítem-cell differentiation // Nature. 2004. Vol. 429, № model 3. P. 41–46.

104. Bhushan A., Rizza R.A., Butler P.C. \_-Cell Replication Is the Primary Mechanism Subserving the Postnatal Expansion of \_-Cell Mass in Humans // Diabetes. 2013. Vol. 57, № 6. P. 1584–1594.

105. Hinault C. et al. Differential expression of cell cycle proteins during ageing of pancreatic islet cells // Diabetes, Obes. Metab. 2008. Vol. 10, № SUPPL. 4. P. 136–146.

106. Iglesias A. et al. Diabetes and exocrine pancreatic insufficiency in E2F1 / E2F2 double-mutant mice // J. Clin. Invest. 2004. Vol. 113, № 10. P. 1398–1407.

107. Bonner-Weir S. et al. β-cell growth and regeneration: Replication is only part of the story // Diabetes. 2010. Vol. 59, № 10. P. 2340–2348.

108. Sharma R. et al. Experimental Models on Diabetes : A Comprehensive Review // Int. J. Adv. Pharm. Sci. 2013. Vol. 4. P. 1–8.

109. Onofre G. et al. SCAVENGER RECEPTOR CD163 AND ITS BIOLOGICAL FUNCTIONS Molecular characterization // Acta Medica Cordoba. 2009. Vol. 52, № 26. P. 57–61.

110. Danilova I. G. et al. Partial recovery from alloxan-induced diabetes by sodium phthalhydrazide in rats //Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2017. – Т. 95. – С. 103-110.

111. Lungu G. et al. Monosodium luminol upregulates the expression of Bc1-2 and VEGF in retrovirus-infected mice through downregulation of corresponding miRNAs //Acta virologica. – 2010. – Т. 54. – №. 1. – С. 27.

112. Eguchi K., Manabe I. Macrophages and islet inflammation in type 2 diabetes //Diabetes, Obesity and Metabolism. – 2013. – Т. 15. – №. s3. – С. 152-158.

113. Ehses J. A. et al. Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes //Diabetes. – 2007. – Т. 56. – №. 9. – С. 2356-2370.

114. Nordmann T. M. et al. The Role of Inflammation in β-cell Dedifferentiation //Scientific reports. – 2017. – Т. 7. – №. 1. – С. 6285.

115. Romer A. I., Sussel L. Pancreatic islet cell development and regeneration //Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity. – 2015. – Т. 22. – №. 4. – С. 255.

116. Assmann A., Hinault C., Kulkarni R. N. Growth factor control of pancreatic islet regeneration and function //Pediatric diabetes. – 2009. – Т. 10. – №. 1. – С. 14-32.

117. Talchai C. et al. Pancreatic β cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic β cell failure //Cell. – 2012. – Т. 150. – №. 6. – С. 1223-1234.

118. Morris D. L. Minireview: emerging concepts in islet macrophage biology in type 2 diabetes //Molecular Endocrinology. – 2015. – Т. 29. – №. 7. – С. 946-962.

119. Cockburn I. L., Ferris W. F. Pancreatic islet regeneration: Therapeutic potential, unknowns and controversy //South African Journal of Science. – 2015. – Т. 111. – №. 7-8. – С. 1-5.

120. Srinivasan K., Ramarao P. Animal models in type 2 diabetes research: an overview //Indian Journal of Medical Research. – 2007. – Т. 125. – №. 3. – С. 451.

121. Ito M. et al. Characterization of low dose streptozotocin-induced progressive diabetes in mice //Environmental toxicology and pharmacology. – 2001. – Т. 9. – №. 3. – С. 71-78.

122 Ghasemi A., Khalifi S., Jedi S. Streptozotocin-nicotinamide-induced rat model of type 2 diabetes //Acta Physiologica Hungarica. – 2014. – Т. 101. – №. 4. – С. 408-420.

123 Masiello P. et al. Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide //Diabetes. – 1998. – Т. 47. – №. 2. – С. 224-229.

124. Rybakov V. B. et al. On the structure of luminol sodium salts //Crystallography Reports. – 2014. – Т. 59. – №. 3. – С. 383-393.

125 Калюжин О.В., Абидов М.Т. Регуляция продукции ИЛ-1 и ФНО галавитом //Бюлл. экспер. биол. и мед.-1999. № 127. С. 42-43.

126. Jukić T., Abidov M., Ihan A. A Tetrahydrophthalazine Derivative» Sodium Nucleinate «Exerts a Potent Suppressive Effect upon LPS-Stimulated Mononuclear Cells in vitro and in vivo //Collegium antropologicum. – 2011. – Т. 35. – №. 4. – С. 1219-1223.

127. Danilova I. G. et al. Partial recovery from alloxan-induced diabetes by sodium phthalhydrazide in rats //Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2017. – Т. 95. – С. 103-110.

128. Lungu G. et al. Monosodium luminol upregulates the expression of Bc1-2 and VEGF in retrovirus-infected mice through downregulation of corresponding miRNAs //Acta virologica. – 2010. – Т. 54. – №. 1. – С. 27.

129. Bruno S., Darzynkiewicz Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki‐67 antibody in HL‐60 cells //Cell proliferation. – 1992. – Т. 25. – №. 1. – С. 31-40.

130. Darzynkiewicz Z. et al. Initiation and termination of DNA replication during S phase in relation to cyclins D1, E and A, p21WAF1, Cdt1 and the p12 subunit of DNA polymerase δ revealed in individual cells by cytometry //Oncotarget. – 2015. – Т. 6. – №. 14. – С. 11735.

131. Austyn J. M., Gordon S. F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage //European journal of immunology. – 1981. – Т. 11. – №. 10. – С. 805-815.

132. Sjöholm Å. Diabetes mellitus and impaired pancreatic β‐cell proliferation //Journal of internal medicine. – 1996. – Т. 239. – №. 3. – С. 211-220.

133. Меньщикова Е. Б. и др. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания. – 2008.