

ИНСУЛИН⁺-КЛЕТКИ И ОСНОВНЫЕ ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ (Pdx1, MafA И Ngn3) В ПЕЧЕНИ ЖИВОТНЫХ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ МОДЕЛИРОВАНИИ САХАРНОГО ДИАБЕТА 1-ГО И 2-ГО ТИПА

© 2021 г. М. Байкенова^{1,2,*}, В. А. Черешнев^{1,2}, К. В. Соколова^{1,2}, И. Ф. Гетте^{1,2},
В. В. Емельянов², И. Г. Данилова^{1,2}

¹ Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук, Российская Федерация, 620049, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106

² Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, Российская Федерация, 620002, г. Екатеринбург, ул. Мира, 19

*e-mail: m.b.baikenova@urfu.ru

Поступила в редакцию 29.10.2020 г.

После доработки 14.01.2021 г.

Принята к публикации 08.02.2021 г.

В связи с высокой распространенностью сахарного диабета (СД) и его осложнений большой интерес представляют инсулин⁺-клетки, обнаруженные в различных органах, которые, вероятно, могут частично компенсировать дефицит инсулина при сахарном диабете. Транскрипционные факторы, такие как Pdx1, MafA и Ngn3 играют важную роль в развитии и функционировании поджелудочной железы. Так, Pdx1 необходим как на начальных этапах развития поджелудочной железы, так и в процессе дифференцировки и созревания β -клеток. MafA имеет важное значение в функциональной активности островковых β -клеток. Ngn3 важен для образования эндокринных клеток-предшественников. Цель исследования: дать характеристику инсулин⁺-клеток печени и оценить экспрессию транскрипционных факторов Pdx1, MafA и Ngn3, вовлеченных в их дифференцировку, при аллоксановой модели СД1 и стрептозотоцин-никотинамидной модели СД2. Эксперимент проводился на крысах-самцах линии Wistar. В крови экспериментальных животных определяли концентрацию глюкозы, гликированного гемоглобина, инсулина, выполняли глюкозотолерантный тест, рассчитывали индекс НОМА-IR. Экспрессию Pdx1 +, MafA + и Ngn3 + исследовали иммуногистохимически. Клетки инсулин +, Pdx1 +, MafA + и Ngn3 + были обнаружены в печени как здоровых животных, так и животных с экспериментальными моделями СД 1-го и 2-го типа. Наибольшее число инсулин⁺-клеток определяется у животных со стрептозотоцин-никотинамидной моделью СД2, при этом клетки локализуются во всех зонах печеночной дольки. При аллоксановой модели СД1 данные клетки определяются в большей степени в периферической зоне печеночной дольки. Выявлены различия в количестве Pdx1⁺, MafA⁺ и Ngn3⁺-клеток печени у интактных животных и при экспериментальном моделировании СД. Была установлена корреляция между количеством клеток Ngn3 + и инсулин + клеток в аллоксан-индуцированном СД, а также между количеством MafA + клеток и инсулин + клеток в обоих типах экспериментального СД. Установлено, что у животных с экспериментальными моделями СД в печени возрастает число инсулин⁺, Pdx1⁺ и MafA⁺-клеток относительно интактных животных. В зависимости от модели СД меняется локализация инсулин⁺-клеток, а также их количество. Вместе с тем обнаружено, что число Pdx1⁺ и MafA⁺-клеток увеличивается при аллоксановой модели СД, относительно стрептозотоцин-никотинамидной модели СД2. Выявлена корреляционная связь между количеством инсулин⁺-клеток и MafA⁺-клеток как при СД1, так и при СД2, и между количеством инсулин⁺-клеток и Ngn3⁺-клеток только при СД1.

Ключевые слова: сахарный диабет, печень, гепатоциты, инсулин⁺-клетки, Pdx1, MafA и Ngn3

DOI: 10.31857/S0044452921030037

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на принципиальные различия в патогенезе СД1 и СД2, при обоих типах заболевания имеет место изменение количества и секреторной активности β -клеток поджелудочной железы. Если

для СД1 снижение количества β -клеток характерно с начала заболевания, то при СД2 масса функционирующих β -клеток снижается значительно медленнее и становится значимой при многолетнем течении болезни [1, 2]. Исследования последних

лет направлены на поиск возможности замещения потери β -клеток поджелудочной железы для достижения стабильного эугликемического состояния [3]. Восстановление массы инсулин-продуцирующих клеток можно рассматривать в качестве альтернативной стратегии терапии СД.

Известно, что инсулин⁺-клетки ранее были обнаружены в головном мозге, костном мозге, селезенке, жировой ткани и печени [4, 5].

Поскольку клетки печени и поджелудочной железы в онтогенезе имеют энтодермальное происхождение, заслуживает внимания способность гепатоцитов дифференцироваться в инсулин-продуцирующие клетки [6]. Кроме того, зрелые гепатоциты и β -клетки поджелудочной железы демонстрируют сходство в профилях экспрессии генов, включая гены, кодирующие транскрипционные факторы, транспортер глюкозы GLUT2 и глюкозофосфорилирующий фермент глюкокиназу [7]. Ключевыми факторами транскрипции в развитии поджелудочной железы являются Pdx1, Ngn3 и MafA. Pdx1 необходим для роста почки поджелудочной железы, Ngn3 — для образования эндокринных клеток-предшественников и MafA для созревания бета-клеток. [8].

Транскрипционный фактор Pdx1 участвует не только в раннем развитии поджелудочной железы, а также в дифференцировке и созревании β -клеток. Вместе с тем Pdx1 связывается с регуляторными элементами гена инсулина и увеличивает транскрипцию м-РНК инсулина [9]. Ngn3 необходим для формирования эндокринных клеток-предшественниц при развитии поджелудочной железы [8]. Мыши с нокаутом Ngn3 характеризовались отсутствием эндокринных клеток в островках поджелудочной железы, следовательно, экспрессия Ngn3 необходима для развития всех типов эндокринных клеток поджелудочной железы у мышей [10]. Транскрипционный фактор MafA посредством регуляции синтеза инсулина и GLUT2 имеет решающее значение для функциональной активности β -клеток. MafA функционирует как непосредственный активатор гена инсулина и обнаруживается уже в зрелых β -клетках [11]. Вместе с тем у мышей db/db и в панкреатических островках людей с СД2 было обнаружено снижение уровня MafA, что расценивают как признак секреторного дефекта β -клеток [12].

Цель данного исследования — дать характеристику инсулин⁺-клеток печени и оценить экспрессию транскрипционных факторов Pdx1, MafA и Ngn3, вовлеченных в их дифференцировку, при аллоксановой модели СД1 и стрептозотоцин-никотинамидной модели СД2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Эксперимент на животных был выполнен в соответствии с принципами Директивы Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС и одобрен этическим комитетом Института иммунологии и физиологии УрО РАН (Протокол № 04/19 от 18.12.2019).

Эксперимент выполнен на 25 крысах-самцах линии Wistar. Экспериментальные животные были распределены на 3 группы: 1-я — интактные животные ($n = 10$), 2-я — животные с аллоксановой моделью сахарного диабета 1-го типа (СД1), ($n = 8$), 3-я — животные со стрептозотоцин-никотинамидной моделью сахарного диабета 2-го типа (СД2) ($n = 7$).

СД1 моделировали путем внутрибрюшинного введения аллоксана, разведенного в 0.85% растворе хлорида натрия, в суммарной дозе 170 мг/кг массы тела животного по модифицированной авторской методике [13]. Для моделирования СД2 животным вводили внутрибрюшинно стрептозотоцин, разведенный в цитратном буфере в дозе 65 мг/кг массы тела животного, с предварительным (за 15 мин) внутрибрюшинным введением водного раствора никотинамида в дозе 110 мг/кг массы тела животного [14]. Животных выводили из эксперимента на 30-е сутки после индукции диабета. Перед выведением животные были лишены пищи за 12 ч до эксперимента, доступ к воде оставляли свободным. Предварительно у крыс брали кровь из хвостовой вены для верификации воспроизведения моделей СД. После проведения срединной лапаротомии у животных извлекали печень. Фрагменты ткани фиксировали в 10% водном растворе нейтрального формалина в течение 24 ч. После 8-часовой промывки материал подвергали стандартной гистологической проводке в автоматизированном тканевом процессоре Leica TP 1020 (Leica Microsystems, Германия) с последующей заливкой материала в парафин в системе Leica EG 1160 (Leica Microsystems, Германия). Срезы изготавливали на микротоме Leica SM 2000R (Leica Microsystems, Германия) толщиной 3–4 мкм.

В крови животных определяли концентрацию глюкозы, гликированного гемоглобина (HbA_{1c}) и инсулина. Концентрацию глюкозы определяли в плазме крови глюкозооксидазным методом наборами реагентов производства “Вектор-Бест” (Россия) HbA_{1c} — в цельной крови методом колоночной хроматографии низкого давления наборами “Гликометест” (“Элта”, Россия). Концентрацию инсулина в плазме крови определяли иммуноферментным методом с использованием набора Rat/Mouse Insulin ELISA (Millipore, США) на иммуноферментном автоматическом анализаторе LAZURITE (Dynex Technologies, США). Для верификации СД2 дополнительно оценивали толерант-

ность к глюкозе и инсулинорезистентность (индекс НОМА-IR). При проведении теста толерантности к глюкозе животным после 12-часового голодания перорально с помощью стальных зондов для перорального дозирования (VetTech Solutions Ltd., Великобритания) вводился раствор глюкозы в

воде в дозе 1 г/кг массы тела животного. Образцы крови были собраны в 0, 30, 60 и 120 мин [15]. Концентрацию глюкозы определяли глюкозооксидазным методом. Индекс НОМА-IR для оценки инсулинорезистентности рассчитывали по формуле 1.

Формула 1 Оценка инсулинорезистентности

$$\text{НОМА-IR} = \frac{\text{инсулин натощак(мкЕд/мл)} \times \text{глюкоза натощак(ммоль/л)}}{22.5}$$

Иммуногистохимический и иммунофлюоресцентный анализ проводили с использованием антител к инсулину и проинсулину (clone INS04+INS05, Invitrogen, США), к Pdx1 (Abcam, США) и антител к MafA и Ngn3 (Biorbyt, Великобритания) по стандартным протоколам производителей антител. Первичные антитела использовали в рабочем разведении 1:200 и инкубировали при 4°C в течение 16 ч. Выявление инсулина велось с использованием авидин-биотин-пероксидазного комплекса, для выявления Pdx1 использовали козы IgG (H + L) к антигенам мыши, конъюгированные с флуоресцентным красителем (Thermo Fisher, США), для выявления MafA и Ngn3 использовались козы IgG (H + L) к антигенам кролика, также конъюгированные с флуоресцентным красителем (Thermo Fisher, США). Для проверки протокола и исключения неспецифического окрашивания проводили постановку негативного и позитивного контроля. Позитивным контролем для иммуногистохимического выявления инсулина, Pdx1, MafA и Ngn3 являлись срезы поджелудочной железы intactных крыс [16, 17]. Негативный контроль окрашивания производили на аналогичных срезах поджелудочной железы по соответствующим протоколам, исключая первичные антитела [17, 18].

Для подсчета инсулин⁺-клеток использовался световой микроскоп Leica (Leica DM 2500, Германия) при увеличении X400, анализ изображений выполняли в программе Leica Application Suite (Leica, Германия), подсчет Pdx1⁺, MafA⁺ и Ngn3⁺-клеток осуществляли на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе LSM 710 (Carl Zeiss, Германия) при увеличении X400 с использованием программы ZEN 2.0 (Carl Zeiss, Германия).

Подсчитывали количество инсулин⁺, Pdx1⁺, MafA⁺ и Ngn3⁺-клеток в печеночных пластинках во всех зонах печеночной долики в 20 полях зрения каждого образца с пересчетом на 1 мм² среза печени.

Статистическую обработку проводили с помощью программ Statistica 6.0 (DELL, США) и Microsoft Excel 2003 (Microsoft, США). Данные представлены в виде среднего ± ошибки среднего ($M \pm m$).

Для проверки гипотезы об однородности двух независимых выборок применялся непараметрический *U*-критерий Манна–Уитни, а также критерий Краскела–Уоллиса. При проверке статистических гипотез использовался уровень значимости $p < 0.05$. Для выявления взаимосвязи количества Pdx1⁺ MafA⁺ и Ngn3⁺-клеток и инсулин⁺-клеток вычисляли коэффициент парной линейной корреляции (*r*) Пирсона.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для верификации моделей СД в крови исследуемых групп определяли концентрацию глюкозы, HbA_{1c} и инсулина. В результате было установлено, что в крови крыс с экспериментальным аллоксановым и стрептозотоцин-никотинамидным диабетом отмечалось достоверное увеличение концентрации глюкозы и HbA_{1c} по сравнению с показателями intactных животных. В группе крыс с аллоксановым диабетом отмечалось снижение концентрации инсулина в плазме крови относительно таковой в intactной группе в 2.6 раза, тогда как при стрептозотоцин-никотинамидной модели концентрации инсулина в плазме крови не обнаруживала статистически значимых отличий от intactной группы, что принципиально отличает данную модель от аллоксанового диабета (табл. 1).

Для верификации модели СД2 был проведен пероральный глюкозотолерантный тест. Установлено, что гликемия натощак и через 30, 60 и 120 мин после нагрузки глюкозой у животных с моделью СД2 была статистически значимо выше гликемии у intactных животных в 1.6 – 2.1 раза. Гликемия натощак у животных со стрептозотоцин-никотинамидным сахарным диабетом составила 9.9 ± 0.3 , а через 2 ч после нагрузки глюкозой — 11.15 ± 0.7 ммоль/л (рис. 1), что указывало на формирование СД.

Также для верификации модели СД2 был установлен индекс инсулинорезистентности НОМА-IR. Полученные данные свидетельствуют об увеличении индекса НОМА-IR у животных с экспериментальной моделью СД 2 на 74% по сравнению с intactными, что свидетельствовало о формировании ин-

Таблица 1. Показатели массы тела, концентрации глюкозы, HbA_{1c}, инсулина и индекса НОМА-IR в экспериментальных группах, M ± m

Показатель Экспериментальная группа Index Experimental group	Интактные животные Intact animals	Животные с аллоксановым сахарным диабетом Animals with alloxan-induced diabetes mellitus	Животные со стрептозотоцин-никотинамидным сахарным диабетом Animals with streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes mellitus
Масса тела животных перед выведением из эксперимента Body weight of animals before euthanasia	312 ± 5.5	270 ± 5.8*	294 ± 6.8*#
Глюкоза, ммоль/л Glucose, mmol/L	5.0 ± 0.3	10.9 ± 0.5*	10.9 ± 0.5*
HbA _{1c} , %	4.4 ± 0.3	6.7 ± 0.8*	6.6 ± 1.0*
Инсулин, мкг/л Insulin, µg/L	1.3 ± 0.2	0.5 ± 0.1*	1.0 ± 0.1 [#]
Индекс НОМА-IR	6.7 ± 1.1	5.8 ± 0.4*	11.6 ± 0.5*#

* — различие по сравнению с показателем интактной группы ($p < 0.05$);# — различие по сравнению с показателем группы аллоксанового диабета ($p < 0.05$).

сулинорезистентности, характерной для СД2 (табл. 1).

Инсулин⁺-клетки определялись в печени всех исследуемых групп. При аллоксановом диабете инсулин⁺-клетки отмечались преимущественно вблизи портальных трактов, тогда как при стрептозотоцин-никотинамидном диабете данные клетки были обнаружены во всех зонах печеночной доли.

Морфометрический анализ показал, что содержание инсулин⁺-клеток увеличивается у животных с экспериментальным СД по сравнению с аналогичным показателем у интактных животных. Наибольшее количество инсулин⁺-клеток наблюдает-

ся у группы со стрептозотоцин-никотинамидным диабетом, превышая приблизительно в 11 и 6 раз число данных клеток у здоровых животных и крыс с аллоксановым диабетом соответственно.

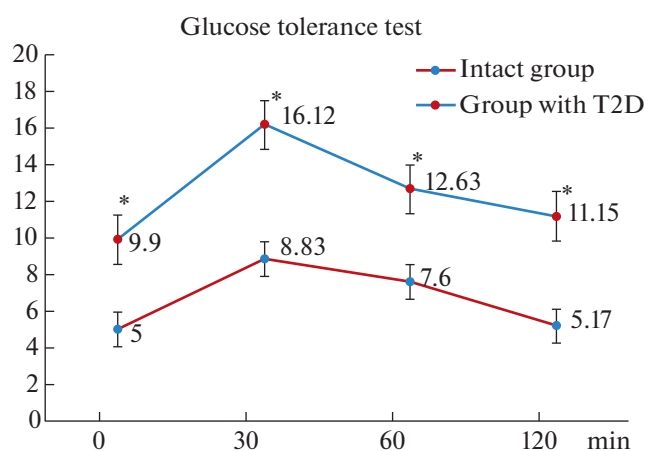
Иммунофлуоресцентное окрашивание печени показало присутствие Pdx1⁺, MafA⁺ и Ngn3⁺-клеток, которые определялись у интактной группы и групп с обеими моделями диабета (рис. 2).

Однако при сравнении количества Pdx1⁺-клеток у интактных животных и животных с экспериментальным СД увеличение числа данных клеток было зафиксировано только у животных с аллоксановым диабетом.

У групп с СД обнаруживалось достоверное увеличение количества MafA⁺-клеток. При аллоксановом диабете число MafA⁺-клеток превышает аналогичный показатель интактной группы в 2 раза, тогда как при стрептозотоцин-никотинамидном диабете количество данных клеток выше в 1.5 раза.

Анализ числа Ngn3⁺-клеток показал, что количество этих клеток одинаково в контроле и у крыс с обеими моделями СД (табл. 2).

Для выявления взаимосвязи количества Pdx1⁺ MafA⁺ и Ngn3⁺-клеток и числа инсулин⁺-клеток вычисляли коэффициент парной линейной корреляции. Результаты корреляционного анализа показали слабую обратную корреляцию между количеством инсулин⁺- и Pdx1⁺-клеток. Взаимосвязь между инсулин⁺-клетками и MafA⁺-клетками характеризуется высоким положительным коэффи-

**Рис. 1.** Тест толерантности к глюкозе.

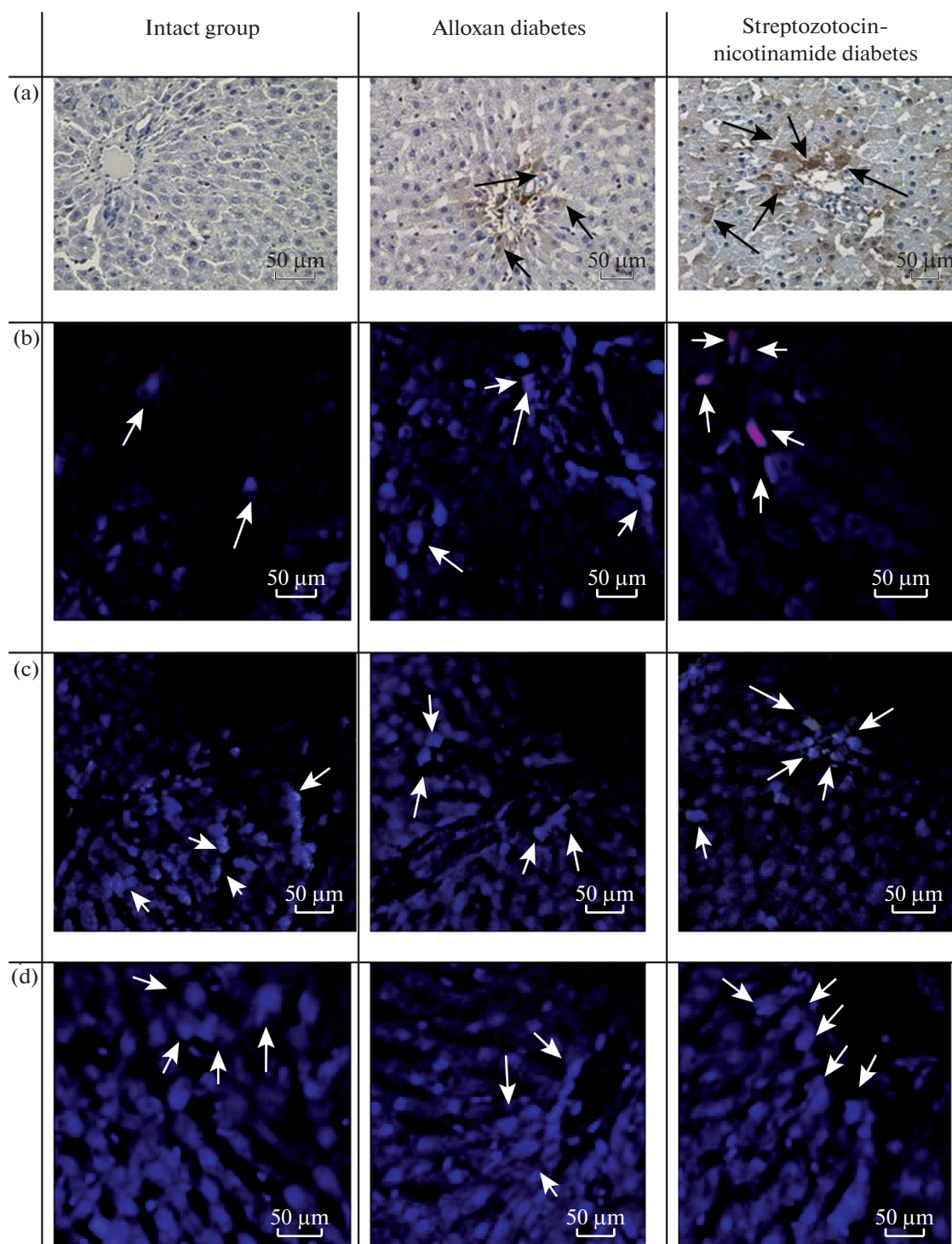


Рис. 2. Печень intactных животных, животных с аллоксановым и стрептозототцин-никотинамидным диабетом. Иммуногистохимическое окрашивание на инсулин (а) и иммуногистохимическое (иммунофлуоресцентное) окрашивание на Pdx1, MafA и Ngn3 (b, c и d). Стрелками показаны инсулин⁺-клетки, Pdx1⁺, MafA⁺ и Ngn3⁺-клетки. Увеличение ×400.

циентом парной линейной корреляции как при обоих типах экспериментального диабета. В то же время между количеством инсулин⁺-клеток и Ngn3⁺-клеток при аллоксановом диабе-

те наблюдается высокая обратная корреляция, тогда как при стрептозототцин-никотинамидном диабете отмечается более низкая взаимосвязь этих параметров (табл. 3).

Таблица 2. Количество инсулин⁺-клеток, Pdx1⁺, MafA⁺ и Ngn3⁺-клеток в печени (шт./мм² среза органа), М ± m

Показатель Index	Интактные животные Intact animals	Животные с аллоксановым сахарным диабетом Animals with alloxan-induced diabetes mellitus	Животные со стрептозотцин-никотинамидным сахарным диабетом Animals with streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes mellitus
Количество инсулин ⁺ -клеток в 1 мм ² среза печени, N/мм ² Number of hepatic insulin ⁺ cells, N per 1 mm ² of section	14.3 ± 0.8	24.9 ± 2.4*	151.5 ± 7.3*#
Количество Pdx1 ⁺ -клеток в 1 мм ² среза печени, N/мм ² Number of hepatic Pdx1 ⁺ cells, N per 1 mm ² of section	32.1 ± 2.1	42.7 ± 1.6*	34.1 ± 2.5
Количество MafA ⁺ -клеток в 1 мм ² среза печени, N/мм ² Number of hepatic MafA ⁺ cells, N per 1 mm ² of section	17.3 ± 1.0	34.6 ± 1.1*	25.6 ± 2.7*#
Количество Ngn3 ⁺ -клеток в 1 мм ² среза печени, N/мм ² Number of hepatic Ngn3 ⁺ cells, N per 1 mm ² of section	91.0 ± 2.5	90.6 ± 2.7	91.9 ± 2.0

* — различие по сравнению с показателем интактной группы ($p < 0.05$);# — различие по сравнению с показателем группы аллоксанового диабета ($p < 0.05$).**Таблица 3.** Коэффициенты парной линейной корреляции между количеством инсулин⁺-клеток и Pdx1⁺, MafA⁺ и Ngn3⁺-клеток печени у крыс

Тип клеток Hepatic cell type	Инсулин ⁺ -клетки при аллоксановом сахарном диабете Insulin ⁺ cells, alloxan-induced diabetes mellitus	Инсулин ⁺ -клетки при стрептозотцин-никотинамидном сахарном диабете Insulin ⁺ cells, streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes mellitus
Pdx1 ⁺ -клетки печени/Pdx1 ⁺ cells	−0.49	−0.25
MafA ⁺ -клетки печени/MafA ⁺ cells	0.88	0.70
Ngn3 ⁺ -клетки печени/Ngn3 ⁺ cells	−0.87	−0.18

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

СД характеризуется хронической гипергликемией, вызванной абсолютным дефицитом инсулина при СД1 и секреторным дефектом β-клеток в сочетании с инсулинорезистентностью при СД2 [19]. Восстановление массы и функциональной активности β-клеток можно рассматривать в качестве перспективной стратегии для лечения обоих типов диабета. Тот факт, что β-клетки поджелудочной железы являются не единственным источником секреции инсулина в организме, подтверждается рядом исследований: данные клетки были найдены в экзокринной части поджелудочной железы, печени, жировой ткани, костном мозге и селезенке, а также в головном мозге. Согласно литературным данным, обнаруженные инсулин⁺-клетки в печени определялись как у диабетических животных, так и у здоровых, причем доказано, что инсулин был

синтезирован именно этими клетками [4]. Вероятно, в норме данные клетки содержатся в организме в небольшом количестве, и при возникновении гипергликемии и связанной с ней СД количество внепанкреатических инсулин⁺-клеток увеличивается. Однако, несмотря на имеющиеся в литературе данные, механизм самопроизвольного появления внепанкреатических инсулин⁺-клеток остается до конца не изученным.

Гепатоциты представляют собой потенциальную мишень для преобразования в инсулин-продуцирующие клетки, ввиду энтодермального происхождения, общих характеристик их раннего развития, включая экспрессию общих регуляторных транскрипционных факторов [6].

Инсулин⁺-клетки определяются в печени как здоровых животных, так и у крыс с экспериментальными моделями СД 1-го и 2-го типа. Данные

инсулин⁺-клетки гистологически по структуре, размерам и расположению соответствуют гепатоцитам. Количество и локализация данных клеток неодинаковы при различных типах диабета. При стрептозотоцин-никотинамидном диабете инсулин⁺-гепатоциты отмечаются в большем количестве и обнаруживаются на протяжении всей печеночной дольки. Тогда как при аллоксановом диабете данные клетки характеризуются небольшим количеством в сравнении со стрептозотоцин-никотинамидной моделью и отмечаются преимущественно в периферической зоне печеночной дольки. Одной из возможных причин их образования считают гипергликемию. Перипортальные гепатоциты (в периферической зоне) имеют доступ к насыщенной кислородом крови из печеночной артерии и питательным веществам, доставляемым из кишечника с портальным кровотоком. Уровень кислорода и питательных веществ снижается по направлению к центральной вене (к центральной зоне печеночной дольки) [20]. В ряде работ было показано образование инсулин⁺-клеток при изменении уровня глюкозы [21]. В нашем эксперименте мы исключаем влияние данного фактора, поскольку гликемия при моделировании обоих типов СД достоверно не отличалась. Можно предположить, что инсулинорезистентность играет определяющую роль в возникновении этих клеток, а наличие инсулина в гепатоцитах связано с нарушением функции инсулинового рецептора и последующей интернализацией гормона в цитоплазму гепатоцита. Однако в экспериментах Н. Кojima и соавт. установлено, что эти клетки могут самостоятельно синтезировать инсулин [4].

Развитие поджелудочной железы и дальнейшая ее деятельность регулируются группой транскрипционных факторов. Среди основных, задействованных в созревании, функционировании β -клеток и секреции инсулина в них выделяют — Pdx1, Ngn3, MafA [22].

В срезах печени исследуемых групп были обнаружены Pdx1⁺, MafA⁺ и Ngn3⁺-клетки, количество которых отличалось в зависимости от типа СД. Так, число Pdx1⁺ и MafA⁺-клеток увеличивается у животных с экспериментальным СД относительно здоровых животных. Однако достоверное увеличение числа Pdx1⁺-клеток обнаруживается только при аллоксановом диабете, тогда как количество MafA⁺-клеток при аллоксановом диабете превышает показатель интактной группы в 2 раза, при стрептозотоцин-никотинамидном диабете — в 1.5 раза, что указывает на дальнейшее формирование этих клеток в инсулин⁺-клетки. Анализ числа Ngn3⁺-клеток показал, что данный показатель остается одинаковым у всех исследуемых групп,

отсюда можно предположить, что неизменное количество этих клеток указывает на наличие предшественников эндокринных клеток, которые при возникновении определенных факторов способны дать начало инсулин-продуцирующим клеткам.

Анализ парной линейной корреляции показал высокую положительную взаимосвязь между количеством инсулин⁺- и MafA⁺-клеток при обоих типах экспериментального СД. В то же время высокий коэффициент парной линейной корреляции указывал на обратную зависимость между количеством инсулин⁺- и Ngn3⁺-клеток, однако, только при моделировании СД 1-го типа. Между количеством инсулин⁺- и Pdx1⁺-клеток отмечалась слабая отрицательная корреляция. Так, у животных с аллоксановым диабетом количество инсулин⁺-клеток в печени меньше, однако, количество Pdx1⁺-клеток увеличивается по сравнению с группой стрептозотоцин-никотинамидного диабета. Известно, что Pdx1 также играет важную роль в формировании раннего панкреатического эпителия, в то время как MafA способен регулировать гены, участвующие в функции β -клеток, такие как GLUT2, GLP1R (рецептор глюкагоноподобного пептида-1), что может указывать на отсутствие взаимосвязи между показателями инсулин⁺-клеток и транскрипционных факторов [23]. Однако наличие в печени транскрипционных факторов поджелудочной железы говорит о том, что инсулин⁺-клетки печени способны в определенных условиях синтезировать инсулин.

Известно, что Ngn3 может быть обнаружен в поджелудочной железе взрослого грызуна только после определенных типов повреждений, когда он временно экспрессируется экзокринными клетками, подвергающимися перепрограммированию в эндокринную сторону. Экспрессия Ngn3 в экзокринной части поджелудочной железы указывает на дедифференцирующую клеточную популяцию, способную функционировать подобно эндокринным клеткам [24]. Развитие печени и поджелудочной железы в процессе органогенеза в примитивной вентральной энтодерме, возможно, оставило обе ткани с плюрипотентными клетками, которые способны дать начало как печеночной, так и панкреатической линиям [25]. Например, клетки со свойствами, практически идентичными свойствам овальных клеток печени, также могут появляться в поджелудочной железе, особенно после абляции ацинарных клеток [26].

В литературе описано несколько процессов перепрограммирования гепатоцитов в инсулин-продуцирующие панкреатические клетки. Одним из наиболее распространенных является аденовирусная трансдукция одного или нескольких ключевых

транскрипционных факторов поджелудочной железы. Экспрессия выбранных генов приводила к увеличению содержания иммунореактивного инсулина в печени и в плазме крови [27, 28]. Установлено, что перепрограммированные гепатоциты демонстрировали секрецию инсулина в ответ на стимуляцию глюкозой и были способны предотвращать гипергликемию [29]. Также имеются данные, указывающие на синтез инсулина в печени животных при гипергликемии. Так, в исследовании R. Ghosh и соавт. показан синтез инсулина в гепатоцитах, культивируемых с глюкозой, а также в меньшем содержании в контрольной группе [21].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что инсулин⁺-клетки определяются в печени здоровых крыс и крыс при экспериментальном моделировании СД 1-го и 2-го типа. Установлена зависимость количества инсулин⁺-клеток от типа СД. Вместе с тем было обнаружено, что в зависимости от типа СД меняется и локализация данных клеток. Также в зависимости от типа СД изменялось количество Pdx1⁺ и MafA⁺-клеток. При моделировании СД1 инсулин⁺-клеток отмечалось меньшее количество по сравнению с моделью СД2, тогда как число Pdx1⁺ и MafA⁺-клеток увеличивалось. При моделировании СД2, напротив, количество инсулин⁺-клеток увеличивается, при этом число Pdx1⁺ и MafA⁺-клеток снижается относительно группы с моделью СД1. Исходя из этого можно предположить, что большое количество инсулин⁺-клеток сопровождается уменьшением Pdx1 и MafA. Число Ngn3⁺-клеток оставалось одинаковым во всех исследуемых группах. Ngn3 действует как своего рода переключатель, определяющий судьбу эндокринных клеток у панкреатических предшественников [30].

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках выполнения бюджетных тем ИИФ УрО РАН: № АААА-А18-118020590108-7; № АААА-А18-118020590107-0.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Vieira A., Druelle N., Avolio F., Napolitano T., Navarro-Sanz S., Silvano S., Collombat P.* (2017) β -Cell Replacement Strategies: The Increasing Need for a " β -Cell Dogma". *Front Genet* 8:75. <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00075>
2. *Bergman R.N., Ader M., Huecking K., Van Citters G.* (2002) Accurate assessment of β -cell function: the hyperbolic correction. *Diabetes* 51 (1): 212–220. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.2007.S212>
3. *Zhou Q., Melton D.A.* (2018) Pancreas regeneration. *Nature* 557 (7705): 351–358. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0088-0>
4. *Kojima H., Fujimiya M., Matsumura K., Nakahara T., Hara M., Chan L.* (2004) Extrapancratic insulin producing cells in multiple organs in diabetes. *PNAS* 101 (8): 2458–2463. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308690100>
5. *Beamish C.A., Strutt B.J., Arany E.J., Hill D.J.* (2016) Insulin-positive, Glut2-low cells present within mouse pancreas exhibit lineage plasticity and are enriched within extra-islet endocrine cell clusters. *Islets* 8 (3): 65–82. <https://doi.org/10.1080/19382014.2016.1162367>
6. *Ruzittu S., Willnow D., Spagnoli F.M.* (2020) Direct Lineage Reprogramming: Harnessing Cell Plasticity between Liver and Pancreas. *Spring Harb Perspect Biol* 12 (7): a035626. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a035626>
7. *Zalzman M., Gupta S., Giri R.K., Berkovich I., Sappal B.S., Karnieli O., Zern M.A., Fleischer N., Efrat S.* (2003) Reversal of hyperglycemia in mice by using human expandable insulin-producing cells differentiated from fetal liver progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (12): 7253–7258. <https://doi.org/10.1073/pnas.1136854100>
8. *Akinci E., Banga A., Tungatt K., Segal J., Eberhard D., Dutton J.R., Slack J.M.W.* (2013) Reprogramming of Various Cell Types to a Beta-Like State by Pdx1, Ngn3 and MafA. *PLoS ONE* 8 (11): e82424. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082424>

9. Jennings R.E., Berry A.A., Kirkwood-Wilson R., Roberts N.A., Hearn T., Salisbury R.J., Blaylock J., Piper Hanley K., Hanley N.A. (2013) Development of the human pancreas from foregut to endocrine commitment. *Diabetes* 62 (10): 3514–3522.
<https://doi.org/10.2337/db12-1479>
10. Schonhoff S.E., Giel-Moloney M., Leiter A.B. (2004) Neurogenin 3-expressing progenitor cells in the gastrointestinal tract differentiate into both endocrine and non-endocrine cell types. *Developmental Biology* 270 (2): 443–454.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.03.013>
11. Olbrot M., Rud J., Moss L.G., Sharma A. (2002) Identification of beta-cell-specific insulin gene transcription factor RIPE3b1 as mammalian MafA. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 (10): 6737–6742.
<https://doi.org/10.1073/pnas.102168499>
12. Conrad E., Stein R., Hunter C.S. (2014) Revealing transcription factors during human pancreatic β cell development. *Trends Endocrinol Metab* 25 (8): 407–414.
<https://doi.org/10.1016/j.tem.2014.03.013>
13. Данилова И.Г., Гетте И.Ф. (2014) Способ моделирования аллоксанового диабета. Патент на изобретение №2534411. [Danilova I.G., Gette I.F. (2014) Method for modeling alloxan diabetes. Patent RF. № 2534411 (In Russ)].
14. Спасов А.А., Воронкова М.П., Сингур Г.Л., Чепляева Н.И., Чепурнова М.В. (2011) Экспериментальная модель сахарного диабета типа 2. *Биомедицина* (3): 12–18. [Spasov A.A., Voronkova M.P., Singur G.L., Chepljaeva N.I., Chepurnova M.V. (2011) Experimental model of type 2 diabetes. *Biomedicine* (3): 12–18. (In Russ.)].
15. Eyth E., Basit H., Smith C.J. (2020) *Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Updated*.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532915/>
16. Hewitt S.M., Baskin D.G., Frevert C.W., Stahl W.L., Rosa-Molinar E. (2014) Controls for immunohistochemistry: the Histochemical Society's standards of practice for validation of immunohistochemical assays. *J Histochem Cytochem* 62 (10): 693–697.
<https://doi.org/10.1369/0022155414545224>
17. Seeberger K.L., Anderson S.J., Ellis C.E., Yeung T.Y., Korbitt G.S. (2014) Identification and differentiation of PDX1 β -cell progenitors within the human pancreatic epithelium. *World J Diabetes* 5 (1): 59–68.
<https://doi.org/10.4239/wjd.v5.i1.59>
18. Kumar G.L., Rudbeck L. (2011) Иммуногистохимические методы: Руководство. Москва. [Kumar G.L., Rudbeck L. (2011) *Immunohistochemical Methods: A Manual*. Moscow].
19. Yechoor V., Liu V., Paul A., Lee J., Buras E., Ozer K., Samson S., Chan L. (2009) Gene Therapy with Neurogenin 3 and Betacellulin Reverses Major Metabolic Problems in Insulin-Deficient Diabetic Mice. *Endocrinology* 150 (11): 4863–4873.
<https://doi.org/10.1210/en.2009-0527>
20. Davies S.P., Reynolds G.M., Stamatakis Z. (2018) Clearance of Apoptotic Cells by Tissue Epithelia: A Putative Role for Hepatocytes in Liver Efferocytosis. *Front Immunol* 9 (44): 1–15.
21. Ghosh R., Karmohapatra S.K., Bhattacharya G., Sinha A.K. (2010) The glucose-induced synthesis of insulin in liver. *Endocrine* 38 (2): 294–302.
<https://doi.org/10.1007/s12020-010-9388-3>
22. Gittes G.K. (2009) Developmental biology of the pancreas: A comprehensive review. *Developmental Biology* 236 (1): 4–35. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.10.024>
23. Matsuoka T., Kawashima S., Miyatsuka T., Sasaki S., Shimo N., Katakami N., Kawamori D. (2017) MafA Enables Pdx1 to Effectively Convert Pancreatic Islet Progenitors and Committed Islet α -Cells Into β -Cells In Vivo. *Diabetes* 66 (5): 1293–1300.
<https://doi.org/10.2337/db16-0887>
24. Gomez D.L., Sheets T.P., Hruban R.H., Oberholzer J., McGarrigle J.J., Shambloot M.J. (2015) Neurogenin 3 Expressing Cells in the Human Exocrine Pancreas Have the Capacity for Endocrine Cell Fate. *Plos One* 10 (8): e0133862.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133862>
25. Deutsch G., Jung J., Zheng M., Lora J., Zaret K.S. (2001) A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm. *Development* 128 (5): 871–881.
26. Meivar-Levy I., Sapir T., Berneman D., Weissbach T., Polak-Charcon S., Ravassard P., Tzakis A.G., Mor E., Ricordi C., Ferber S. (2011) Human Liver Cells Expressing Albumin and Mesenchymal Characteristics Give Rise to Insulin-Producing Cells. *J Transplantation Article ID* 252387.
<https://doi.org/10.1155/2011/252387>
27. Ferber S., Halkin A., Cohen H., Ber I., Einav Y., Goldberg I., Barshack I., Seijffers R., Kopolovic J., Kaiser N., Karasik A. (2000) Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia. *Nat Med* 6: 568c572.
<https://doi.org/10.1038/75050>
28. Zhu Y., Liu Q., Zhou Z., Ikeda Y. (2017) PDX1, Neurogenin-3, and MAFA: critical transcription regulators for beta cell development and regeneration. *Stem Cell Res Ther* 8:240–245.
<https://doi.org/10.1186/s13287-017-0694-z>
29. Banga A., Greder L., Dutton J., Slack J.M.W. (2014) Stable insulin-secreting ducts formed by reprogramming of cells in the liver using a three-gene cocktail and a PPAR agonist. *Gene Ther* 21:19–27.
<https://doi.org/10.1038/gt.2013.50>
30. Gradwohl G., Dierich A., LeMeur M., Guillemot F. (2000) Neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (4): 1607–1611.
<https://doi.org/10.1073/pnas.97.4.1607>

INSULIN-POSITIVE CELLS AND MAJOR TRANSCRIPTION FACTORS (Pdx1, MafA AND Ngn3) IN THE LIVER OF ANIMALS IN RAT EXPERIMENTAL MODELS OF TYPE 1 AND TYPE 2 DIABETES MELLITUS

M. Baikenova^{a,b,#}, V. A. Chereshev^{a,b}, K. V. Sokolova^{a,b}, I. F. Gette^{a,b},
V. V. Emelyanov^b, and I. G. Danilova^{a,b}

^a Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russia

^b B.N. Yeltsin Ural Federal University, Yekaterinburg, Russia

[#]e-mail: m.b.baikenova@urfu.ru

Due to a high occurrence of diabetes mellitus (DM) and its complications, insulin-positive cells detected in different organs are of great interest as they can probably partially compensate for insulin deficiency in diabetes mellitus. The development of pancreatic β -cells is regulated by the consecutive expression of transcription factors, among which Pdx1, MafA and Ngn3 are most extensively explored. Specifically, these factors have been reported to be able to transdifferentiate a broad variety of cell types into insulin-positive cells. The goal of this study was to characterize insulin-positive (insulin⁺) cells in the liver and to evaluate the expression of transcription factors Pdx1, MafA and Ngn3 involved in their differentiation in an alloxan-induced rat model of type 1 diabetes mellitus (T1D) and streptozotocin-nicotinamide-induced rat model of type 2 diabetes mellitus (T2D). Experiments were carried out on male Wistar rats. In experimental animals, plasma levels of glucose, glycosylated hemoglobin and insulin were determined. The oral glucose tolerance test was performed and the insulin resistance index (HOMA-IR) was calculated. The expression of Pdx1⁺, MafA⁺ and Ngn3⁺ was investigated immunohistochemically. Insulin⁺, Pdx1⁺, MafA⁺ and Ngn3⁺ cells were detected in the liver both of healthy animals and those with experimental models of T1D and T2D. The largest number of insulin⁺ cells was found in animals with streptozotocin-nicotinamide-induced T2D, wherein cells were localized throughout the hepatic lobule. In an alloxan-induced model of T1D, these cells were detected mainly at the periphery of the hepatic lobule. The number of Pdx1⁺, MafA⁺ and Ngn3⁺ hepatic cells was different in intact animals vs. those with experimental DM. A correlation was established between the number of Ngn3⁺ cells and insulin⁺ cells in alloxan-induced DM, as well as between the number of MafA⁺ cells and insulin⁺ cells in both types of experimental DM. Thus, in rats with both experimental models of DM, the number of insulin⁺, Pdx1⁺ and MafA⁺ cells in the liver increases compared to intact animals. Localization and the number of insulin⁺ cells varies depending on the experimental model of DM. At the same time, the number of Pdx1⁺ and MafA⁺ cells increases in an alloxan-induced model of T1D compared to a streptozotocin-nicotinamide-induced model of T2D. There is a correlation between the number of insulin⁺ and MafA⁺ cells both in T1D and T2D models and between the number of insulin⁺ and Ngn3⁺ cells in a T1D model only.

Keywords: diabetes mellitus, liver, hepatocytes, insulin-positive cells, Pdx1, MafA, Ngn3