DOI: 10.22138/2500-0918-2021-18-2-68-77

УДК 616.36-003.93

М.Б. Байкенова [1, 2], К.В. Соколова [2], И.Ф. Гетте [2], И.Г. Данилова [2]

ВЛИЯНИЕ АМИНОФТАЛГИДРАЗИДА (НАТРИЯ) НА ИНСУЛИН$^+$ И PDX1$^+$-КЛЕТКИ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ САХАРНОГО ДИАБЕТА I ТИПА

[1] Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина, г. Екатеринбург, Российская Федерация;
[2] Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Российская Федерация

Резюме. ***Цель исследования:*** оценить количество и функциональную активность инсулин$^+$-клеток печени в ответ на модуляцию функциональной активности макрофагов у крыс при моделировании сахарного диабета 1 типа. ***Материалы и методы:*** эксперимент проводился на крысых-самцах линии Wistar, которые были разделены на 3 группы: интактная, СД и СД$^+$АФГ. Для моделирования СД вводили 170 мг/кг аллоксана внутрибрюшинно, доза АФГ составляла 2 мг/кг внутримышечно (всего 20 инъекций в течение 30 суток). Использованы биохимические, иммуноферментные, иммуногистохимические и статистические методы исследования. ***Результаты***: у диабетических крыс после введения АФГ выявлено увеличение количества инсулин$^+$-гепатоцитов и инсулин$^+$-синусоидальных клеток относительно соответствующих показателей в группе СД. Вместе с тем, возрастает общее количество синусоидальных и Pdx1$^+$-клеток печени как у животных с СД, так и СД$^+$АФГ. Установлено, что содержание инсулина в цитоплазме инсулин$^+$-гепатоцитов достоверно выше в группе СД$^+$АФГ относительно показателя интактной группы и группы СД, что свидетельствует о влиянии АФГ на повышение функциональной активности инсулин$^+$-гепатоцитов. Усиление экспрессии инсулина в клетках печени при модуляции активности макрофагов может вносить вклад в коррекцию гипергликемии в группе диабетических крыс, получавших АФГ. ***Выводы***: введение АФГ приводит к увеличению количества инсулин$^+$-гепатоцитов и их инсулин-продуцирующей функции, а также инсулин$^+$-синусоидальных клеток у животных с экспериментальным СД. Выявлено увеличение общего числа синусоидальных клеток печени при введении АФГ животным с аллоксан-индуцированным СД. Вместе с тем действие АФГ способствует усилению экспрессии Pdx1$^+$-фактора дифференцировки инсулин-продуцирующих клеток в печени диабетических животных.

Ключевые слова: сахарный диабет, печень, аминофталгидразид, инсулин$^+$-клетки, Pdx1$^+$-клетки

Конфликт интересов отсутствует.
Контактная информация автора, ответственного за переписку:
Байкенова Мадина Багатчановна
m.b.baikenova@urfu.ru
Дата поступления 12.05.2021 г.
Образец цитирования:
Байкенова М.Б., Соколова К.В., Гетте И.Ф., Данилова И.Г. Влияние аминофталгидразида (натрия) на инсулин$^+$ и Pdx1$^+$-клетки печени крыс при моделировании сахарного диабета I типа. [Электронный ресурс] Вестник уральской медицинской академической науки. 2021, Том 18, №2, с. 68–77, DOI: 10.22138/2500-0918-2021-18-2-68-77

Введение

Сахарный диабет (СД) представляет серьезную медико-социальную проблему, обусловленную его распространенностью, тенденцией к росту числа больных, а также высокой инвалидизацией пациентов [1]. Несмотря на крупные успехи в клинической и экспериментальной терапии сахарного диабета, достигнутые за последние 20 лет, частота заболеваемости СД только увеличивается, и по прогнозам ВОЗ эта тенденция будет сохраняться [2]. Печень играет ключевую роль в гомеостазе глюкозы,

поскольку она накапливает гликоген и производит глюкозу путем гликогенолиза и глюконеогенеза в постабсорбционном периоде [3]. СД является метаболическим заболеванием, которое затрагивает все органы и системы организма, в том числе и печень [4]. Основным механизмом развития сахарного диабета, способствующим повреждению печени, является окислительный стресс, который активирует транскрипцию проапоптотических генов и повреждает гепатоциты [5]. Помимо гепатоцитов, печень также содержит синусоидальные клетки, которые составляют около 33-35% от общего количества клеток печени. Синусоидальные клетки печени располагаются вдоль печеночных синусоидов и включают в себя эндотелиальные клетки, звездчатые макрофаги (клетки Купфера), перисинусодальные липоциты (клетки Ито), pit-клетки а также дендритные клетки. Синусоидальные клетки обладают способностью к фагоцитозу и пиноцитозу и участвуют в широком спектре иммунологических реакций [6]. Деструктивные процессы в печени при СД 1 типа развиваются одновременно с воспалительным процессом и при участии активированных макрофагов. Макрофаги печени состоят из клеток Купфера, которые являются самоподдерживающимися немигрирующими тканевыми резидентными фагоцитами и моноцитарных макрофагов. Клетки Купфера необходимы для поддержания печеночного и системного гомеостаза, уничтожают бактерии, погибшие клетки печени и их фрагменты и располагаются преимущественно в перипортальных областях и составляют около 30% от всех синусоидальных клеток. [7-8]. Моноцитарные макрофаги в свою очередь появляются в ответ на возникающее повреждение [9].

Обнаруженные рядом исследователей внепанкреатические инсулин-позитивные клетки в различных органах можно рассматривать как дополнительный источник инсулина в организме при повреждении β-клеток [10]. Имеются данные литературы, указывающие на положительный результат применения аминофталгидразида (АФГ) при аллоксановом СД. Установлено, что введение АФГ способствует повышению пролиферативной активности β-клеток островков поджелудочной железы у животных с экспериментальным аллоксан-индуцированныи СД [11]. Возможно, активация макрофагов печени способна повлиять на количество и функциональную активность инсулин$^{+}$-клеток печени у животных с воспроизведением СД 1 типа.

Известно, что синтез инсулина в β-клетках контролируется на уровне транскрипции. Фактор транскрипции Pdx1 (панкреатический дуоденальный гомеобокс 1) непосредственно связывается с промотором гена инсулина и способствует транскрипции м-РНК инсулина и поддержанию β-клеточной функции во время дифференцировки β-клеток поджелудочной железы [12]. Данный ген необходим для развития экзокринной и эндокринной частей поджелудочной железы в самом раннем периоде ее развития [13]. В процессе дифференцировки клеток поджелудочной железы, в β-клетках экспрессия данного гена усиливается, а в экзокринных клетках и клетках протоков экспрессия Pdx1 гена, напротив, постепенно снижается. Активность Pdx1 сохраняется в дифференцированном состоянии только в β-клетках [14]. В связи с этим, нами также было проанализировано количество Pdx1^{+}-клеток в печени экспериментальных групп.

Цель данного исследования оценить количество и функциональную активность инсулин+-клеток печени в ответ на модуляцию функциональной активности макрофагов у крыс при моделировании сахарного диабета 1 типа.

Материалы и методы

В ходе эксперимента было использовано 24 крысы линии Wistar. Экспериментальное исследование проводилось в соответствии с принципами Директивы 2010/63 / ЕС Европейского парламента и Европейского Совета (Официальный журнал Европейского союза, 2010 г.) и одобрено этическим комитетом Института иммунологии и физиологии УрО РАН (протокол №04/19 от 18.12.2019). Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП ИИФ УрО РАН.

СД 1 типа моделировали внутрибрюшинным введением аллоксана из расчета 170 мг/кг массы крысы в 0,85% растворе хлорида натрия [15]. Аминофталгидразид вводили животным с СД из расчета 2 мг/кг массы внутримышечно, 20 инъекций по схеме в течение 1 месяца (начиная со второго месяца эксперимента). Животные были разделены на 3 группы по 8 животных в каждой: интактные животные, животные с аллоксановым СД (СД) и животные с аллоксановым СД и введением АФГ (СД+АФГ), (табл. 1). Животные всех групп были выведены из эксперимента на 60-е сутки путем внутримышечного введения пентобарбитала натрия в дозе 40 мг/кг. Всех животных после выведения взвешивали.

DOI: 10.22138/2500-0918-2021-18-2-68-77

Для верификации диабета брали кровь из хвостовой вены, определяли уровень глюкозы, гликированного гемоглобина (HbA1c) и инсулина. Концентрацию глюкозы определяли с помощью набора («Витал Диагностикс», Российская Федерация). Содержание гликированного гемоглобина (HbA1c) в цельной крови определяли методом аффинной гель-хроматографии с использованием набора ГЛИКОГЕМОТЕСТ («ЭЛТА», Российская Федерация), оптическую плотность измеряли спектрофотометром DU-800 («Beckman», США). Содержание инсулина в крови определяли методом иммуноферментного анализа с использованием набора Rat/MouseInsulin ELISA (Millipore, США) и иммуноферментного автоматического анализатора LAZURITE (Dynex Technologies, США). Образцы печени крыс фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина. После 8-ми часовой промывки материал подвергали стандартной гистологической проводке в автоматизированном тканевом процессоре Leica TP 1020 (Leica Microsystems, Германия) с последующей заливкой тканей в парафин в системе Leica EG 1160 (Leica Microsystems, Германия). Срезы толщиной 3 – 4 мкм были изготовлены на ручном санном микротоме Leica SM 2000R (Leica Microsystems, Германия).

Иммуногистохимическое исследование печени проводилось с помощью антител к инсулину и проинсулину (cloneINS04+INS05, Invitrogen, США) и антител к Pdx1 (Abcam, США) по стандартным протоколам производителей. Парафиновые срезы предварительно подвергались депарафинизации. Первичные антитела использовали в рабочем разведении 1:200 и инкубировали при 4°С в течение 16 часов. Выявление инсулина велось с использованием авидин-биотин пероксидазного комплекса, для выявления Pdx1 использовали IgG (H+L) козы против мыши, конъюгированные с флуоресцентным красителем (Thermo Fisher, США). Для проверки протокола и исключения неспецифического связывания и ложно-позитивного окрашивания проводили постановку негативного и позитивного контроля. Для инсулина и выявления Pdx1 гена позитивным контролем являются β-клетки островков Лангерганса здоровых крыс [16]. Негативные контроли окрашивания производили на аналогичных срезах поджелудочной железы по соответствующим протоколам, исключая первичные антитела [17-18].

Морфометрический анализ каждой экспериментальной группы включал: подсчет инсулин$^+$-гепатоцитов, инсулин$^+$-синусоидальных клеток и Pdx1$^+$-клеток, расположенных во всех зонах печеночной дольки с перерасчетом на 1 мм² среза печени. Функциональную активность инсулин$^+$ клеток оценивали по оптической плотности (ОП) инсулина в их цитоплазме.

Микроскопическое исследование инсулин$^+$-гепатоцитов производили на световом микроскопе Leica (Leica DM 2500, Германия), анализ изображений выполняли в программе ВидеоТест – Морфология 5.0 (ВИДЕОТЕСТ, Россия), подсчёт Pdx1$^+$-клеток — на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе LSM 710 (Carl Zeiss, Германия) с использованием программы ZEN 2.0 (Carl Zeiss, Германия).

Статистическая обработка осуществлялась с помощью программ Statistica 6.0 (DELL, США) и MicrosoftExcel 2003 (Microsoft, США). Для статистического анализа непараметрических выборок использовали Mann-Whitney U-test, а также критерий Краскела-Уоллиса. При проверке статистических гипотез использовался уровень значимости 5% ($p<0,05$). Данные представлены в виде среднего ± ошибка среднего (M±m).

Результаты исследования

На первом этапе исследования для верификации развития сахарного диабета и оценки гипогликемической эффективности использования АФГ было проведено измерение концентрации глюкозы и HbA1c, в цельной крови животных групп СД и СД+АФГ. Было показано, что введение АФГ сопровождается снижением концентрации глюкозы и HbA1c относительно аналогичных показателей в группе СД, а также способствует повышению концентрации инсулина (табл. 1). Введение АФГ сопровождалось более значительным увеличением массы тела крыс в группе СД+АФГ по сравнению с массой животных в группе СД к концу эксперимента (табл. 1).

Иммуногистохимический анализ показал, что в срезах печени крыс всех исследуемых групп определяются гепатоциты с положительной реакцией на инсулин. Локализуются данные клетки, как в центральном отделе печеночной дольки, так и в периферическом. Вместе с тем инсулин$^+$-клетки отмечаются и в синусоидном просвете.

on-line ISSN 2500-0918
vestnikural.ru

Таблица 1
Концентрация глюкозы, HbA1c и инсулина в крови
Table 1
Concentration of glucose, HbA1c and insulin in the blood

Показатель/группа Parameter/group	Интактная/Intact	СД/DM	СД+АФГ/DM+АРН
Глюкоза, ммоль/л Glucose, mmol/L	5,00±0,30	10,46±0,49*	6,33±0,27* #
HbA1c, % HbA1c, %	4,40±0,30	6,53±0,20 *	3,80±0,08* #
Инсулин, мкг/л Insulin, mkg/L	1,28±0,19	0,45±0,09*	2,53±0,64*#
Масса тела, г Body weight, g	312±5	346±2*	386±4* #

* — данные достоверны по сравнению с интактной группой (p<0,05);
# — данные достоверны по сравнению с группой СД (p<0,05);
* — p<0.05 as compared to intact animals;
# — p<0.05 as compared to DM group.

Таблица 2
Количество различных клеток печени, шт/мм² среза печени и оптическая плотность цитоплазмы (ОП) инсулин+-клеток, ед. оптической плотности
Table 2
The number of various liver cells, N / mm² of the liver section and the optical density (OD) of cytoplasm in insulin+ cells, units of optical density

Показатель/экспериментальная группа / Parameter/experimental group	Интактная/Intact	СД/DM	СД+АФГ / DM+АРН
Инсулин$^+$-гепатоциты / Insulin$^+$-hepatocytes	14,26±0,84	22,78±1,93*	36,19±4,29* #
Синусоидальные клетки / Sinusoidal cells	387,11±14,19	679,86±27,77*	829,62±38,55* #
Макрофаги / Macrophages	116,11±2,20	203,96±8,29*	248,87±11,52* #
Инсулин$^+$-синусоидальные клетки / Insulin$^+$-sinusoidal cells	13,82±0,63	21,72 ± 1,51*	27,71±2,41* #
Pdx1$^+$-клетки / Pdx1$^+$-cells	32,11±2,14	43,54±2,48*	45,45±2,31*
ОП инсулин$^+$-гепатоцитов / OD in insulin$^+$-hepatocytes	0,20±0,01	0,17±0,01*	0,49±0,01* #
ОП цитоплазмы инсулин$^+$-синусодиальных клеток / OD in insulin$^+$-sinusoidal cells	0,29±0,24	0,35±0,01*	0,37±0,43*

* — данные достоверны по сравнению с интактной группой (p<0,05);
# — данные достоверны по сравнению с группой СД (p<0,05);
* — p<0.05 as compared to intact animals; # — p<0.05 as compared to DM group.

При анализе общего числа инсулин$^+$-гепатоцитов было установлено, что количество их значительно выше в группах СД и СД+АФГ по сравнению с показателем интактной группы (табл. 2). При сравнении групп СД и СД+АФГ выявлено достоверное увеличение количества инсулин$^+$-гепатоцитов после введения АФГ диабетическим крысам. Также зафиксировано увеличение общего количества синусоидальных клеток, в том числе и макрофагов у животных с воспроизведением СД, но наибольшее число данных клеток наблюдается в группе СД+АФГ. На фоне введения АФГ возрастает количество инсулин$^+$-синусоидальных клеток. Установлено, что данный показатель увеличивается относительно

DOI: 10.22138/2500-0918-2021-18-2-68-77

показателя интактной группы и группы СД. Количество Pdx1$^+$-клеток достоверно увеличилось у диабетических крыс относительно показателя интактной группы, однако, достоверных различий между показателем в группе СД и у леченных АФГ крыс не обнаружено (табл. 2).

При анализе функциональной активности инсулин$^+$-гепатоцитов было установлено, что в группе СД показатель оптической плотности цитоплазмы ниже аналогичного показателя интактной группы. При введении АФГ, напротив, продукция инсулина в инсулин$^+$-гепатоцитах выше в 2.4 и 2.8 раз по сравнению с показателем интактной группы и группы СД соответственно. В группах СД и СД+АФГ наблюдается увеличение оптической плотности цитоплазмы инсулин$^+$-синусоидальных клеток, по сравнению с таковой в интактной группе (табл. 2).

Обсуждение результатов

СД — это метаболическое заболевание, характеризующееся гипергликемией и высокой заболеваемостью во всем мире, которое затрагивает все системы организма, включая печень. Печень участвует в обменных процессах организма, включая гомеостаз глюкозы. Последствия гипергликемии приводят к увеличению реакции окислительного стресса и усилению воспалительной реакции [19]. Известно, что окислительный стресс активирует транскрипцию проапоптотических генов и повреждает гепатоциты [5].

В настоящей работе изучено влияние АФГ на количество инсулин$^+$-гепатоцитов и Pdx1$^+$-клеток печени и их функциональной активности у животных с экспериментальным СД. В качестве иммуномодулятора использовали аминофталгидразид, который ранее уже применялся в качестве коррекции метаболических нарушений при аллоксановом диабете [11]. Полученные в ходе исследования результаты подтверждают полученные ранее данные о положительном влиянии АФГ на течение СД. При определении концентрации глюкозы, HbA1c в крови животных было установлено, что введение АФГ животным с СД способствует снижению данных показателей относительно аналогичного показателя у групп без введения АФГ, а также увеличению содержания инсулина.

До недавнего времени β-клетки островков поджелудочной железы считались единственным источников инсулина в организме. Однако все больше в источниках литературы появляется информации о наличии внепанкреатических инсулин-позитивных клеток в различных органах [10, 20]. В печени исследуемых групп инсулин$^+$-гепатоциты обнаружены во всех частях печеночной дольки как у интактных животных, так и у крыс с экспериментальным СД. Увеличение количества инсулин$^+$-гепатоцитов при развитии экспериментального СД можно рассматривать как компенсаторную реакцию в ответ на деструкцию β-клеток островков поджелудочной железы [11], но функциональная активность этих клеток, определяемая по величине оптической плотности инсулина в их цитоплазме, снижена по сравнению с тем же показателем в гепатоцитах интактных животных. В отличие от крыс группы СД у животных, получавших инъекции АФГ, не только возросло количество инсулин$^+$-гепатоцитов, но увеличилась также их функциональная активность.

Синусоидальные клетки, составляющие 33-35% от всех клеток печени и преимущественно представленные клетками Купфера, способны взаимодействовать между собой, участвуя как в деструкции, так и в восстановительном росте органа [21]. Увеличение количества синусоидальных клеток в целом и, в частности, макрофагов при моделировании СД, может быть обусловлено протеканием обоих процессов: аутоиммунной агрессии в отношении органа и его компенсаторном ремоделировании. У диабетических животных, леченных АФГ, синусоидальных клеток и макрофагов становится больше, чем у нелеченых животных, и, вероятно, эти клетки в большей степени участвуют в регуляции восстановительного роста и поддержании целостности печени. В то же время среди синусоидальных клеток диабетических животных увеличивается количество инсулин$^+$-клеток, а при введении АФГ показатель возрастает еще больше, но по содержанию инсулина эти клетки не отличаются у животных, получавших и не получавших АФГ.

Инсулин$^+$-клетки в печени необходимы для снабжения органа глюкозой, поскольку печень относится к инсулин-зависимым органам, поступление глюкозы в клетки печени определяется встраиванием транспортера GLUT-4 в наружную цитоплазматическую мембрану при взаимодействии инсулина с инсулиновым рецептором. Вероятно, в гепатоцитах потребность в глюкозе больше, чем у синусоидальных клеток, так как гепатоциты не только обеспечивают собственные нужды, но используют глюкозу для создания запасов гликогена, что согласуется с большей экспрессией

on-line ISSN 2500-0918
vestnikural.ru

инсулина в инсулин$^+$-гепатоцитах по сравнению с инсулин$^+$-синусоидальными клетками.

Фактор транскрипции Pdx1 определяет скорость транскрипции и стабильность м-РНК инсулина. Pdx1 является как фактором дифференцировки β-клеток во время эмбриогенеза, так и регулятором инсулин-продуцирующей функции β-клеток панкреатических островков в постнатальном периоде развития [22]. Экспрессия гена Pdx1 начинается в эпителиальных клетках панкреатического зачатка, однако далее в процессе дифференцировки поджелудочной железы экспрессия Pdx1 усиливается только в β-клетках, а в экзокринных эпителиоцитах ацинусов и выводных протоков постепенно снижается. Предполагают, что в постнатальном периоде экспрессия Pdx1 сохраняется у здоровых животных только в β-клетках [14]. Известно, что эктопическая экспрессия Pdx1 способна дифференцировать клетки в сторону β-клеток [23]. Pdx1$^+$-клетки обнаруживаются в срезах печени всех исследуемых групп. Количество Pdx1$^+$-клеток увеличивается в группе с аллоксановым СД и с введением АФГ после моделирования СД относительно показателя здоровых животных.

Таким образом, можно заключить, что модулятор макрофагов АФГ способен усиливать компенсаторные реакции в печени, развивающиеся при моделировании СД и направленные на снабжение органа глюкозой.

Заключение

Впервые показано, что введение АФГ способствует увеличению количества инсулин$^+$-гепатоцитов и их инсулин-продуцирующей функции, а также инсулин$^+$-синусоидальных клеток у животных с экспериментальным СД. Установлено увеличение общего числа синусоидальных клеток печени при введении АФГ животным с аллоксан-индуцированным СД. Вместе с тем действие АФГ способствует усилению экспрессии Pdx1$^+$-фактора дифференцировки инсулин-продуцирующих клеток в печени диабетических животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вербовая Н.И., Долгих Ю.А., Вербовой А.Ф., Галкин Р.А. Микрососудистые осложнения сахарного диабета. Эндокринология: новости, мнения, обучение. 2019; 8 (4): 44–54. doi: 10.24411/2304-9529-2019-14006.

2. Информационный бюллетень Всемирной организации здравоохранения. Отчет от января 2015 г.

3. Picardi A., D'Avola D., V. U. Gentilucci Galati G., Fiori E., Spataro S., Afeltra A. Diabetes in chronic liver disease: from old concepts to new evidence. Metabolism Research and Reviews. 2006; 22(4): 274-283. https://doi.org/10.1002/dmrr.636

4. Калмыкова З.А., Кононенко И.В., Майоров А.Ю. Сахарный диабет и хронические заболевания печени. Часть1: общие механизмы этиологии и патогенеза. Терапевтический архив. 2019; 10: 106-111. DOI: 10.26442/00403660.2019.10.000165.

5. Manna P, Das J, Ghosh J, Sil PC. Contribution of type 1 diabetes to rat liver dysfunction and cellular damage via activation of NOS, PARP, IkappaBalpha/NF-kappaB, MAPKs, and mitochondria-dependent pathways: Prophylactic role of arjunolic acid. Free Radic Biol Med. 2010; 48:1465–84. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.02.025.

6. Leclercq A., Morais A. S., Schroyen B., Hul N., Geerts A. Insulin resistance in hepatocytes and sinusoidal liver cells: Mechanisms and consequences. 2007; 47(1): 142-156. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.04.002

7. Krenkel, O., Tacke, F. Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. Nat Rev Immunol. 2017; 17: 306–321. https://doi.org/10.1038/nri.2017.11.

8. Li P., He K., Li J., Liu Z., Gong J. The role of Kupffer cells in hepatic diseases. Molecular Immunology. 2017; 85:222-229. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.02.018

9. Kazankov, K., Jørgensen, S.M.D., Thomsen, K.L. et al. The role of macrophages in nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2019; 16: 145–159. https://doi.org/10.1038/s41575-018-0082-x.

10. Kojima H., Fujimiya M., Matsumura K., Nakahara T., Hara M., Chan L. Extrapancreatic insulin producing cells in multiple organs in diabetes. PNAS. 2004; 101(8): 2458-2463. https://doi.org/10.1073/pnas.0308690100

11. Danilova I. G., Bulavintceva T. S., Gette I. F., Medvedeva S.Yu., Emelyanov V. V., Abidov M. T. Partial recovery from alloxan-induced diabetes by sodium phthalhydrazide in rats. Biomedicine & Pharmacotherapy.

DOI: 10.22138/2500-0918-2021-18-2-68-77

2017; 95: 103-110. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.117.
12. Andrali S. S., Smapley M. L., Vanderford N. L., Ozcan S., Glucose regulation of insulin gene expression in pancreatic β-cells. Biochemical Journal. 2008; 415(1): 1–10.
13. Ohlsson H, Karlsson K, Edlund T. IPF1, ahomeodomain-containing transactivator of the insulin gene. 1993; 12: 4251-4259.
14. Oster A., Jensen J., Serup P., Galante P., Madsen O. D, Larsson L.I. Rat endocrine pancreatic development in relation to two homeobox gene products (Pdx-1 and Nkx 6.1). J Histochem Cytochem.1998; 46: 707-715.
15. Данилова И.Г., Гетте И.Ф. Способ моделирования аллоксанового диабета. Патент на изобретение №2534411; 2014.
16. Hewitt SM, Baskin DG, Frevert CW, Stah lWL, Rosa-Molinar E. Controls for immunohistochemistry: the Histochemical Society's standards of practice for validation of immunohistochemic alassays. J Histochem Cytochem. 2014; 62(10): 693–697. doi:10.1369/0022155414545224.
17. Seeberger KL, Anderson SJ, Ellis CE, Yeung TY, Korbutt GS. Identification and differentiation of PDX1 β-cell progenitors within the human pancreatic epithelium. World J Diabetes. 2014; 5(1): 59–68. doi:10.4239/wjd.v5.i1.59.
18. George L. Kumar, Lars Rudbeck. Под редакцией Г.А. Франка и П. Г. Малькова. Immunohistochemical methods (Иммуногистохимические методы): – М., 2011: 224-227.
19. Mendes-Braz M., Martins J. O. Diabetes Mellitus and Liver Surgery: The Effect of Diabetes on Oxidative Stress and Inflammation. Mediators of Inflammation. 2019; 2018: 11-22. https://doi.org/10.1155/2018/2456579
20. Tang D., Cao L., Burkhardt B. R., Xia C., Litherland S. A., Atkinson M. A., Yang L. In vivo and in vitro characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow. Diabetes Jul. 2004; 53(7): 1721-1732. DOI:10.2337/diabetes.53.7.1721
21. Jacobs F., Wisse E., Geest B. The Role of Liver Sinusoidal Cells in Hepatocyte-Directed Gene Transfer. 2010; 176(1): 14-21. https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090136
22. Hui H., Perfetti R. Pancreas duodenum homeobox-1 regulates pancreas development during embryogenesis and islet cell function in adulthood. European Journal of Endocrinology. 2002; 146 (2): 129-141, doi: 10.1530/eje.0.1460129
23. Koblas T., Leontovyc I , Loukotova S., Kosinova L. Saudek F. Reprogramming of Pancreatic Exocrine Cells AR42J Into Insulin-producing Cells Using mRNAs for PDX1, Ngn3, and MafA Transcription Factors. Official journal of the American Society of Gene & Cell Therapy. 2016; 5:1-12.

Авторы
Байкенова Мадина Багатчановна
Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук
Младший научный сотрудник
Российская Федерация, 620049, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106
Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина
Аспирант
Российская Федерация, 620002, г. Екатеринбург, ул. Мира, 19
m.b.baikenova@urfu.ru

Соколова Ксения Викторовна
Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук
Младший научный сотрудник
Российская Федерация, 620049, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106
kssocolova@bk.ru

Гетте Ирина Федоровна
Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук
Кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
Российская Федерация, 620049, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106
i.goette@yandex.ru

Данилова Ирина Георгиевна
Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук
Доктор биологических наук, доцент, заведующий лабораторией морфологии и биохимии
Российская Федерация, 620049, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106
ig-danilova@yandex.ru

M.B. Baikenova [1, 2], K.V. Sokolova [2], I.F. Gette [2], I.G. Danilova [2]

IMPACT OF (SODIUM) AMINOPHTHALHYDRAZIDE ON INSULIN$^+$ AND PDX1$^+$ RAT LIVER CELLS IN EXPERIMENTAL MODEL OF DIABETES MELLITUS TYPE I

[1] Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin, Yekaterinburg, Russian Federation;
[2] Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Science, Yekaterinburg, Russian Federation

Abstract. ***Aim***: to evaluate quantity and functional activity of insulin$^+$ hepatic cells in response to modulation of macrophage functional activity in rats in the modelling of diabetes mellitus type 1. ***Materials and methods***: experiment was carried out on male Wistar rats, which were divided into 3 groups: intact, DM and DM+APH. To model DM alloxan in the dose of 170 mg/kg was injected intraperitoneally, the dose of APH was 2 mg/kg intramuscularly (a total of 20 injections within 30 days). Biochemical, enzyme immunoassay, immunohistochemical and statistical research methods were used. Results: compare to the DM, in DM+APH group the increasing numbers of insulin$^+$ hepatocytes and insulin$^+$ sinusoidal cells were detected. At the same time, the total number of sinusoidal cells and Pdx1$^+$ liver cells increase in both DM and DM+APH groups. It was found, that the content of insulin in the cytoplasm of insulin$^+$ hepatocytes significantly higher in the DM+APH group, compare to intact and diabetic animals, which indicates the impact of APH at the growth of functional activity of insulin$^+$ hepatocytes. An increase in the expression of insulin in the hepatic cells at the modulation of macrophage activity by APH may contribute to the correction of hyperglycemia in diabetic rats. ***Conclusion***: introduction of APH leads to an increase in the number of insulin$^+$ hepatocytes and their insulin-producing function, as well as insulin$^+$ sinusoidal cells in animals with experimental diabetes. An increase in the total number of sinusoidal hepatic cells when the APH was administered in animals with alloxan-induces DM was revealed. At the same time, the action of APH enhances the expression of Pdx1 — a factor of differentiation for insulin-producing cells in the liver of diabetic animals.

Keywords: diabetes mellitus, liver, immunomodulators, aminophthalhydrazide, insulin$^+$-cells, pdx1$^+$-cells

There is no conflict of interest.
Contact details of the corresponding author:
Madina B. Baikenova
m.b.baikenova@urfu.ru
Received 12.05.2021
For citation:
Baikenova M.B., Sokolova K.V., Gette I.F., Danilova I.G. Impact of (Sodium) Aminophthalhydrazide on Insulin$^+$ and Pdx1$^+$ Rat Liver Cells in Experimental Model of Diabetes Mellitus Type. [Online] Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki. = Journal of Ural Medical Academic Science. 2021, Vol. 18, no. 2, pp. 68–77. DOI: 10.22138/2500-0918-2021-18-2-68-77 (In Russ)

REFERENCES

1. Verbovaja N.I., Dolgih Ju.A., Verbovoj A.F., Galkin R.A. Microvascular complications of diabetes mellitus. Endocrinology: news, opinions, training. 2019; 8 (4): 44–54. doi: 10.24411/2304-9529-2019-14006. (in Russian)
2. Information bulletin of the World Health Organization. January 2015 report. (in Russian)

3. Picardi A., D'Avola D., V. U. Gentilucci Galati G., Fiori E., Spataro S., Afeltra A. Diabetes in chronic liver disease: from old concepts to new evidence. Metabolism Research and Reviews. 2006; 22(4): 274-283. https://doi.org/10.1002/dmrr.636

4. Kalmykova Z.A., Kononenko I.V., Majorov A.Ju. Diabetes mellitus and chronic liver disease. Part 1: general mechanisms of etiology and pathogenesis. Therapeutic archive. 2019; 10: 106-111. DOI: 10.26442/00403660.2019.10.000165. (in Russian)

5. Manna P, Das J, Ghosh J, Sil PC. Contribution of type 1 diabetes to rat liver dysfunction and cellular damage via activation of NOS, PARP, IkappaBalpha/NF-kappaB, MAPKs, and mitochondria-dependent pathways: Prophylactic role of arjunolic acid. Free Radic Biol Med. 2010; 48:1465–84. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.02.025.

6. Leclercq A., Morais A. S., Schroyen B., Hul N., Geerts A. Insulin resistance in hepatocytes and sinusoidal liver cells: Mechanisms and consequences. 2007; 47(1): 142-156. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.04.002

7. Krenkel, O., Tacke, F. Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. Nat Rev Immunol. 2017; 17: 306–321. https://doi.org/10.1038/nri.2017.11.

8. Li P., He K., Li J., Liu Z., Gong J. The role of Kupffer cells in hepatic diseases. Molecular Immunology. 2017; 85:222-229. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.02.018

9. Kazankov, K., Jørgensen, S.M.D., Thomsen, K.L. et al. The role of macrophages in nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2019; 16: 145–159. https://doi.org/10.1038/s41575-018-0082-x.

10. Kojima H., Fujimiya M., Matsumura K., Nakahara T., Hara M., Chan L. Extrapancreatic insulin producing cells in multiple organs in diabetes. PNAS. 2004; 101(8): 2458-2463. https://doi.org/10.1073/pnas.0308690100

11. Danilova I. G., Bulavintceva T. S., Gette I. F., Medvedeva S.Yu., Emelyanov V. V., Abidov M. T. Partial recovery from alloxan-induced diabetes by sodium phthalhydrazide in rats. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2017; 95: 103-110. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.117.

12. Andrali S. S., Smapley M. L., Vanderford N. L., Ozcan S., Glucose regulation of insulin gene expression in pancreatic β-cells. Biochemical Journal. 2008; 415(1): 1–10.

13. Ohlsson H, Karlsson K, Edlund T. IPF1, ahomeodomain-containing transactivator of the insulin gene. 1993; 12: 4251-4259.

14. Oster A., Jensen J., Serup P., Galante P., Madsen O. D, Larsson L.I. Rat endocrine pancreatic development in relation to two homeobox gene products (Pdx-1 and Nkx 6.1). J Histochem Cytochem.1998; 46: 707-715.

15. Danilova I.G., Gette I.F. A method for modeling alloxan diabetes. Invention patent №2534411; 2014. (in Russian)

16. Hewitt SM, Baskin DG, Frevert CW, Stah lWL, Rosa-Molinar E. Controls for immunohistochemistry: the Histochemical Society's standards of practice for validation of immunohistochemic alassays. J Histochem Cytochem. 2014; 62(10): 693–697. doi:10.1369/0022155414545224.

17. Seeberger KL, Anderson SJ, Ellis CE, Yeung TY, Korbutt GS. Identification and differentiation of PDX1 β-cell progenitors within the human pancreatic epithelium. World J Diabetes. 2014; 5(1): 59–68. doi:10.4239/wjd.v5.i1.59.

18. George L. Kumar, Lars Rudbeck. Под редакцией Г.А. Франка и П. Г. Малькова. Immunohistochemical methods (Иммуногистохимические методы): – М., 2011: 224-227.

19. Mendes-Braz M., Martins J. O. Diabetes Mellitus and Liver Surgery: The Effect of Diabetes on Oxidative Stress and Inflammation. Mediators of Inflammation. 2019; 2018: 11-22. https://doi.org/10.1155/2018/2456579

20. Tang D., Cao L., Burkhardt B. R., Xia C., Litherland S. A., Atkinson M. A., Yang L. In vivo and in vitro characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow. Diabetes Jul. 2004; 53(7): 1721-1732. DOI:10.2337/diabetes.53.7.1721

21. Jacobs F., Wisse E., Geest B. The Role of Liver Sinusoidal Cells in Hepatocyte-Directed Gene Transfer. 2010; 176(1): 14-21. https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090136

22. Hui H., Perfetti R. Pancreas duodenum homeobox-1 regulates pancreas development during embryogenesis and islet cell function in adulthood. European Journal of Endocrinology. 2002; 146 (2): 129-141, doi: 10.1530/eje.0.1460129

23. Koblas T., Leontovyc I , Loukotova S., Kosinova L. Saudek F. Reprogramming of Pancreatic Exocrine Cells AR42J Into Insulin-producing Cells Using mRNAs for PDX1, Ngn3, and MafA Transcription Factors. Official journal of the American Society of Gene & Cell Therapy. 2016; 5:1-12.

Authors
Madina B. Baikenova
Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences
Junior researcher
106 Pervomaiskaya str. Yekaterinburg Russian Federation 620049
Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin
PhD student
19 Mira str. Yekaterinburg Russian Federation 620002
m.b.baikenova@urfu.ru

Ksenia V. Sokolova
Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences
Junior researcher
106 Pervomaiskaya str. Yekaterinburg Russian Federation 620049
kssocolova@bk.ru

Irina F. Gette
Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences
Candidate of Science in Biology, Senior Researcher
106 Pervomaiskaya str. Yekaterinburg Russian Federation 620049
i.goette@yandex.ru

Irina G. Danilova
Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences
Doctor of Biological Science, Associate Professor, Head of the Laboratory of Morphology and Biochemistry
106 Pervomaiskaya str. Yekaterinburg Russian Federation 620049
ig-danilova@yandex.ru