

Л.А. Среднева<sup>1</sup>, Ю.Н. Ключева<sup>2</sup>, В.В. Емельянов<sup>2</sup>, Е.А. Мухлынина<sup>1</sup>,  
И.Ф. Гетте<sup>1</sup>, И.Г. Данилова<sup>1</sup>

## ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫМ СОСТОЯНИЕМ ЭНДОКРИННОГО АППАРАТА И ОСТРОВКОВЫМ ФИБРОЗОМ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ СТАРЫХ КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ АЛЛОКСАНОВЫМ ДИАБЕТОМ И ПРИ ЕГО КОРРЕКЦИИ АЛЬФА-ЛИПОЕВОЙ КИСЛОТОЙ

<sup>1</sup> ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук», г. Екатеринбург, Российская Федерация;

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Российская Федерация

**Резюме.** Существующие научные данные о возрастных изменениях островкового аппарата поджелудочной железы противоречивы, в том числе это касается возраст-зависимого островкового фиброза. Вызывает вопросы взаимосвязь различных морфофункциональных изменений в инсулярном аппарате и возможность их фармакологической коррекции антиоксидантами, например, хорошо зарекомендовавшей себя в терапии диабетической кардиомиопатии и полинейропатии альфа-липоевой кислотой. **Цель** — выявить взаимосвязь между морфофункциональным состоянием эндокринного аппарата и островковым фиброзом поджелудочной железы старых крыс с аллоксан-индуцированным диабетом и при его коррекции альфа-липоевой кислотой. **Материалы и методы.** Исследование проведено на 40 белых крысах-самцах линии Wistar, которые были разделены на 4 группы: 1-я — молодые интактные животные возрастом 6 месяцев (n=10), 2-я — контрольная группа, старые интактные животные возрастом 18 месяцев (n=10), 3-я — старые животные возрастом 18 месяцев с экспериментальным сахарным диабетом (n=10), 4-я — старые животные возрастом 18 месяцев с экспериментальным сахарным диабетом и введением альфа-липоевой кислоты (n=10). Сахарный диабет моделировали путем трехкратного внутривентриального введения раствора аллоксана в суммарной дозе 170 мкг/кг веса животного. Альфа-липоевая кислота вводилась животным внутримышечно в дозе 4 мг/100 г веса животного в течение 30 дней. Проведено морфометрическое исследование островкового аппарата поджелудочной железы с последующим иммуногистохимическим окрашиванием на инсулин, а также выполнена оценка гистотопографической локализации коллагена. **Результаты.** У животных в условиях старения наблюдалось снижение функции эндокринного аппарата за счет уменьшения количества бета-клеток и повышения содержания коллагена в островках Лангерганса, что подтверждалось повышением уровня глюкозы в плазме крови и снижением экспрессии инсулина в островках. Формирование аллоксанового диабета усиливало данные изменения. Введение альфа-липоевой кислоты старым животным с экспериментальным диабетом способствовало увеличению количества островков, их клеточности, содержания островковых бета-клеток и их инсулин-продуцирующей активности, снижению уровня глюкозы в крови и выраженности фибротических явлений в островках. **Заключение.** В данном исследовании впервые показано, что введение альфа-липоевой кислоты, обладающей антиоксидантной способностью, вызывало уменьшение выраженности островкового фиброза у старых животных с диабетом на фоне увеличения количества инсулиноцитов в островке и снижения концентрации глюкозы. Таким образом, альфа-липоевая кислота оказывает не только противодиабетическое, но и геропротекторное и антифиброгенное действие при формировании аллоксанового диабета у старых крыс.

**Ключевые слова:** поджелудочная железа, бета-клетки, аллоксановый диабет, островковый фиброз, альфа-липоевая кислота

Конфликт интересов отсутствует.

Контактная информация автора, ответственного за переписку:

Мухлынина Елена Артуровна

elena.mukhlynina@yandex.ru

Дата поступления 14.05.2022 г.

Образец цитирования:

Среднева Л.А., Ключева Ю.Н., Емельянов В.В., Мухлынина Е.А., Гетте И.Ф., Данилова И.Г. Взаимосвязь между морфофункциональным состоянием эндокринного аппарата и островковым фиброзом поджелудочной железы старых крыс с экспериментальным аллоксановым диабетом и при его коррекции альфа-липоевой кислотой. Вестник уральской медицинской академической науки. 2022, Том 19, №3, с. 210–221, DOI: 10.22138/2500-0918-2022-19-3-210-221

## Введение

Сахарный диабет (СД) является возраст-ассоциированным заболеванием, которое влияет на качество жизни и ее продолжительность, а также приводит к инвалидизации и высокому уровню смертности. Согласно данным International Diabetes Federation (IDF) самая высокая распространенность СД наблюдается среди лиц старше 65 лет, и на 2019 год количество людей с СД в возрасте 65–99 лет составляло 135,6 млн, что соответствует 19,3% от общего числа людей преклонного возраста. По прогнозам IDF число таких больных к 2030 году увеличится до 195,2 млн, а к 2045 году — 276,2 млн. [1].

Данные о возрастном изменении состояния островкового аппарата противоречивы, что связано с использованием разных методов его оценки. Так, в ряде работ было показано, что с возрастом эндокринная часть поджелудочной железы претерпевает морфологические и метаболические изменения, что, в свою очередь, способствует нарушению регуляции уровня глюкозы в крови. Данные изменения затрагивают преимущественно инсулин-продуцирующие бета-клетки. За счет снижения пролиферативной активности и усиления апоптоза инсулиноцитов происходит общее снижение функциональной массы бета-клеток островков [2, 3]. Однако в литературе можно встретить противоположное мнение. По данным некоторых зарубежных исследователей, в отличие от экзокринной части поджелудочной железы, структура островков относительно не претерпевает значительных изменений с возрастом. Несмотря на атрофию, фиброз и липоматоз экзокринной ткани органа, масса бета-клеток остается постоянной с 20 до 100 лет [4]. При этом тематика возраст-зависимого островкового фиброза поджелудочной железы, который также способен влиять на состояние островкового аппарата, остается до конца не изученной. На сегодняшний день имеется ограниченное число работ, посвященных исследованию данного явления. Известно, что в тяжелых случаях СД 1 или 2 типа может развиваться фиброз поджелудочной железы, который приводит к дальнейшей дисфункции органа [5]. Также отмечается, что СД может способствовать прогрессированию уже имеющихся хронических заболеваний поджелудочной железы, например, хронического панкреатита, усугубляя фиброз, воспаление и атрофию органа [6]. В ряде исследований было показано, что у больных СД может наблюдаться фиброз островков Лангерганса [7, 8], аналогичные патоморфологические изменения отмечаются и у грызунов с экспериментальным сахарным диабетом [9, 10]. Ключевая роль в данном патологическом процессе отводится миофибробластоподобным клеткам поджелудочной железы — панкреатическим звездчатым клеткам (ПЗК), которые составляют 4–7% всех паренхиматозных клеток в железе [11] и могут находиться в двух принципиально отличных функциональных состояниях — покоящемся и активированном. В процессе активации ПЗК характеризуются повышенным синтезом  $\alpha$ -гладкомышечного актина (главный маркер активного фенотипа ПЗК), глиального фибриллярного кислого белка, коллагена I и III типа и других белков внеклеточного матрикса (ECM), способствуя тем самым фиброзу в поджелудочной железе [11, 12].

Гипергликемия является одним из факторов активации ПЗК. Высокий уровень глюкозы в крови способен стимулировать фиброгенные эффекты различными путями, среди которых отмечают усиление генерации активных форм кислорода и интенсификацию свободнорадикальных реакций [5]. Поэтому в качестве корректора нарушений, возникающих на фоне развития СД, была выбрана альфа-липоевая кислота (АЛК), обладающая выраженной антиоксидантной активностью, высоким терапевтическим потенциалом, что подтверждено большим числом экспериментальных и клини-

ческих исследований [13, 14]. При этом антифиброгенный эффект АЛК был отмечен только в работах, посвященных лечению диабетической кардиомиопатии [15].

**Цель работы:** выявить взаимосвязь между морфофункциональным состоянием эндокринного аппарата и островкового фиброза поджелудочной железы старых крыс с аллоксан-индуцированным диабетом и при его коррекции альфа-липоевой кислотой.

### Материалы и методы

Исследование выполнено на 40 белых крысах-самцах линии Wistar. Эксперимент на животных был одобрен Этическим комитетом ИИФ УрО РАН (протокол №2 от 06.02.2017) и выполнен в соответствии с принципами, сформулированными в Директиве 2010/63/ЕС Европейского парламента и Европейского Совета от 22 сентября 2010 года о защите животных, используемых в научных целях (Официальный журнал Европейского союза, 2010 г.).

Сахарный диабет 1 типа моделировали путем трехкратного внутривнутрибрюшинного введения раствора аллоксана (Диа-м, Россия), разведенного в 0,9% растворе хлорида натрия, в суммарной дозе 170 мг/кг веса животного по авторской методике [16]. Альфа-липоевая кислота (препарат «Октолипен», Россия) вводилась животным с СД в виде готового раствора (30 мг/мл) один раз в два дня в течение 30 дней. Препарат ставился внутримышечно с дозировкой 4 мг/100 г веса животного.

Все животные были разделены на 4 группы: 1-я — молодые интактные животные возрастом 6 месяцев (n=10), 2-я — контрольная группа, старые интактные животные возрастом 18 месяцев (n=10), 3-я — старые животные возрастом 18 месяцев с экспериментальным СД (n=10), 4-я — старые животные возрастом 18 месяцев с экспериментальным СД и введением АЛК (n=10). Через 60 дней все животные выводились из эксперимента посредством внутримышечного введения препарата «Золетил» (Virbac, Франция) в дозе 200 мг/кг.

Концентрацию глюкозы в плазме крови определяли унифицированным глюкозооксидазным колориметрическим методом набором «Глюкоза-Ново (500)» («Вектор-Бест», г. Новосибирск), содержание гликированного гемоглобина (HbA1c) в цельной крови — методом аффинной гель-хроматографии с использованием набора реактивов «Диабет-тест» (ФОСФОСОРБ, г. Москва).

Материалом для гистологического и морфологического исследования послужили образцы поджелудочной железы крыс, которые фиксировались в 10% растворе нейтрального формалина в течение 24 часов. Стандартная проводка биоматериала была выполнена с помощью автоматического процессора Leica TP1020 (Leica Microsystems, Германия) с последующей заливкой материала в парафин на станции Leica EG1160 (Leica Microsystems, Германия). На ручном санном микротоме Leica SM2000R (Leica Microsystems, Германия) изготавливались срезы толщиной 3–4 мкм. Готовые срезы окрашивали гематоксилином и эозином при помощи автостейнера Leica ST5010 (Leica Microsystems, Германия). Гистотопографическую локализацию коллагена оценивали в срезах, окрашенных с использованием набора Picro-Sirius Red Stain Kit (Abcam, Великобритания). Иммуногистохимическое исследование поджелудочной железы проводили по стандартному протоколу. Для визуализации инсулин-позитивных клеток на готовые срезы наносили первичные антитела к инсулину Anti-Rat Insulin/Proinsulin antibody (Thermo Scientific, США) в разведении 1:200, инкубировали при 37°C в течение 60 минут. Далее срезы инкубировали с нанесенными вторичными антителами Goat anti-mouse, biotin conjugated (BD Bioscience, США) в разведении 1:50 в аналогичных условиях (30 минут, 37°C). Для визуализации антиген-позитивных клеток использовали тест-систему Novolink TM Polymer Detection System (Novocastra Lab. Ltd, Великобритания), включающую пероксидазу хрена, конъюгированную со стрептавидином, хромогенный субстрат 3,3-диаминобензидин (DAБ) в забуференном растворе. ДАБ-позитивные клетки идентифицировали по коричневому окрашиванию цитоплазмы клеток. Для исключения неспецифического окрашивания на срезах поджелудочной железы здоровых интактных крыс производили постановку негативного контроля — на аналогичных срезах по соответствующему протоколу без использования первичных антител [17].

Микроскопическое исследование проводили на световом микроскопе Leica DM2500 (Leica Microsystems, Германия), анализ изображений выполняли в программах Leica Application Suite V4.9 (Leica Microsystems, Германия) и ImageJ 1.50e (National Institutes of Health, США) с использо-

ванием макроса для автоматического подсчета на основе RGB-модели. Морфометрический анализ в каждой экспериментальной группе включал: подсчет площади островков Лангерганса ( $\text{мкм}^2$ ), общего количества островков в пересчете на  $1 \text{ мм}^2$  паренхимы поджелудочной железы ( $\text{N}/\text{мм}^2$ ), общего количества клеток в островках в пересчете на 1000 клеток на  $100 \text{ мм}^2$  островков Лангерганса ( $\text{N} \times 10^3 / 100 \text{ мм}^2$ ). Для оценки инсулин-синтезирующего аппарата островков измеряли долю островков с положительной реакцией на инсулин и бета-клеток в них. Для морфометрии коллагена островков Лангерганса определяли его абсолютную площадь в островке ( $\text{мкм}^2$ ), и процент от площади островка.

Статистическую обработку полученных данных выполняли с использованием программ GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software Inc., США) и Microsoft Excel 2013 (Microsoft, США). Данные представлены в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего ( $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ ). Для сравнения нескольких независимых групп по количественному признаку использовали непараметрический критерий Краскела-Уоллиса (Kruskal-Wallis test). При сравнении двух независимых групп применяли критерий Манна-Уитни (Mann-Whitney U-test). Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

### Результаты исследования

Анализ биохимических параметров выявил значимое увеличение уровня глюкозы в крови 18-месячных животных по сравнению с молодыми (таблица 1). Исследование образцов поджелудочной железы молодых и зрелых животных показало морфологические изменения эндокринного аппарата железы с возрастом (таблица 2). В группе старых животных наблюдалось изменение формы и размеров островков. Наряду с мелкими и средними островками увеличивалось количество крупных дезорганизованных островков неправильной формы. Морфометрическое исследование показало значимое увеличение средней площади панкреатических островков в группе старых животных почти в два раза. При этом общее количество островков, наоборот, снизилось на 77%. Среди оставшихся панкреатических островков выявлено снижение доли инсулин-позитивных островков на 13%. При оценке фиброзных изменений у старых животных было отмечено резкое увеличение площади, занимаемой коллагеновыми волокнами, что нашло отражение в значимом увеличении процента коллагена в островке в 7 раз (рисунок 1).

Спустя 30 дней с момента введения аллоксана в третьей группе отмечалось усиление гипергликемии, что подтверждалось и увеличением уровня гликированного гемоглобина. Гистологическая картина поджелудочной железы данной группы животных характеризовалась наличием большого количества крупных островков неправильной формы. Также выявлялись дегенеративные изменения поджелудочной железы разной степени выраженности: отек междольковой соединительной ткани, полнокровие кровеносных сосудов органа и гиалиноз сосудов. Гиалиноз сосудов свидетельствует о развившейся на фоне СД микроангиопатии. В эндокринной части железы наблюдались инсулиноциты в состоянии плазмолита или пикноза, отмечалась вакуолизация цитоплазмы. Морфометрические исследования выявили уменьшение количества островков и резкое снижение в них количества клеток по сравнению с показателем контрольной группы (таблица 2). При иммуногистохимическом исследовании поджелудочной железы отмечено значимое снижение доли инсулин-позитивных островков и бета-клеток в них на 44% и 88%, соответственно. Площадь коллагена и его процентное содержание в островках Лангерганса сохранялись на уровне контрольной группы.

По сравнению с группой без коррекции, у животных с введением АЛК наблюдалось значимое снижение уровня глюкозы в крови на 31%, также была выявлена тенденция к уменьшению содержания гликированного гемоглобина в плазме крови, хотя это и не нашло статистического подтверждения (таблица 1). Животные данной группы имели меньшую площадь островков Лангерганса, при этом количество самих островков и их клеточность значительно увеличились в 3 и 4 раза, соответственно (таблица 2). Отмечалось повышение функциональной активности инсулярного аппарата поджелудочной железы, что выражалось в увеличении доли инсулин-позитивных островков на 33%, а доли бета-клеток в них — в 43 раза. Площадь, занимаемая коллагеном в островке, в данной группе снизилась на 64%.

Таблица 1  
Содержание глюкозы и гликированного гемоглобина в крови крыс экспериментальных групп

Table 1  
The blood glucose and glycated hemoglobin level in experimental groups of rat

	Молодые животные / Young rats	Старые животные (контроль) / Old rats (control)	Аллоксановый диабет / Alloxan-induced diabetes	Аллоксановый диабет + альфа-липоевая кислота / Alloxan-induced diabetes + alpha-lipoic acid
Глюкоза, ммоль/л / Glucose, mmol/l	6,00±0,20	9,80±0,04*	14,60±2,93*, **	10,06±0,06*, ***
HbA1c, % / HbA1c, %	4,10±0,20	5,08±0,30	6,10±0,71*	5,70±0,37*

Примечание: \* — Статистически значимые различия с группой молодых животных (<0,05), \*\* — Статистически значимые различия с группой старых животных (<0,05), \*\*\* — Статистически значимые различия с группой аллоксанового диабета (<0,05).

Note: \* — Significant differences with young rats (p<0,05); \*\* — Significant differences with old rats (p<0,05); \*\*\* — Significant differences with alloxan-induced diabetes rats (p<0,05).

Таблица 2  
Морфометрические показатели островкового аппарата поджелудочной железы крыс экспериментальных групп

Table 2  
Morphometric parameters of the pancreatic islets in experimental groups of rat

	Молодые животные / Young rats	Старые животные (контроль) / Old rats (control)	Аллоксановый диабет / Alloxan-induced diabetes	Аллоксановый диабет + альфа-липоевая кислота / Alloxan-induced diabetes + alpha-lipoic acid
Площадь островков, мкм <sup>2</sup> / Area of the islets, μm <sup>2</sup>	11962±1917	22830±2981*	23605±2459*	12859±2770**, ***
Количество островков, N/мм <sup>2</sup> / Number of pancreatic islets, N/mm <sup>2</sup>	1,80±0,20	0,42±0,01*	0,24±0,10*, **	0,67±0,11*, **, ***
Количество клеток в островке, N*10 <sup>3</sup> /мм <sup>2</sup> / Number of cells in the pancreatic islets, N*10 <sup>3</sup> /mm <sup>2</sup>	8,67±0,24	6,54±3,20	2,31±0,20*, **	8,16±2,42**, ***
Доля инсулинпозитивных островков, % / Percent of pancreatic islets with positive insulin staining, %	100±0	87,00±2,40*	49,00±1,07*, **	65,00±2,70*, **, ***
Доля β-клеток в островке, % / Percent of β-cells in the pancreatic islets, %	81,30±1,70	86,73±23,57	0,99±0,001*, **	42,10±11,90*, **, ***
Площадь коллагена островков, мкм <sup>2</sup> / Area of collagen of pancreatic islet, μm <sup>2</sup>	82,81±32,63	991,60±193,60*	830,82±171,85*	299,97±87,62*, ***
% коллагена / Percent of collagen	0,61±0,19	4,03±0,43*	3,69±0,61*	2,71±0,54*

Примечание: \* — Статистически значимые различия с группой молодых животных (<0,05), \*\* — Статистически значимые различия с группой старых животных (<0,05), \*\*\* — Статистически значимые различия с группой аллоксанового диабета (<0,05).

Note: \* — Significant differences with young rats (p<0,05); \*\* — Significant differences with old rats (p<0,05); \*\*\* — Significant differences with alloxan-induced diabetes rats (p<0,05).

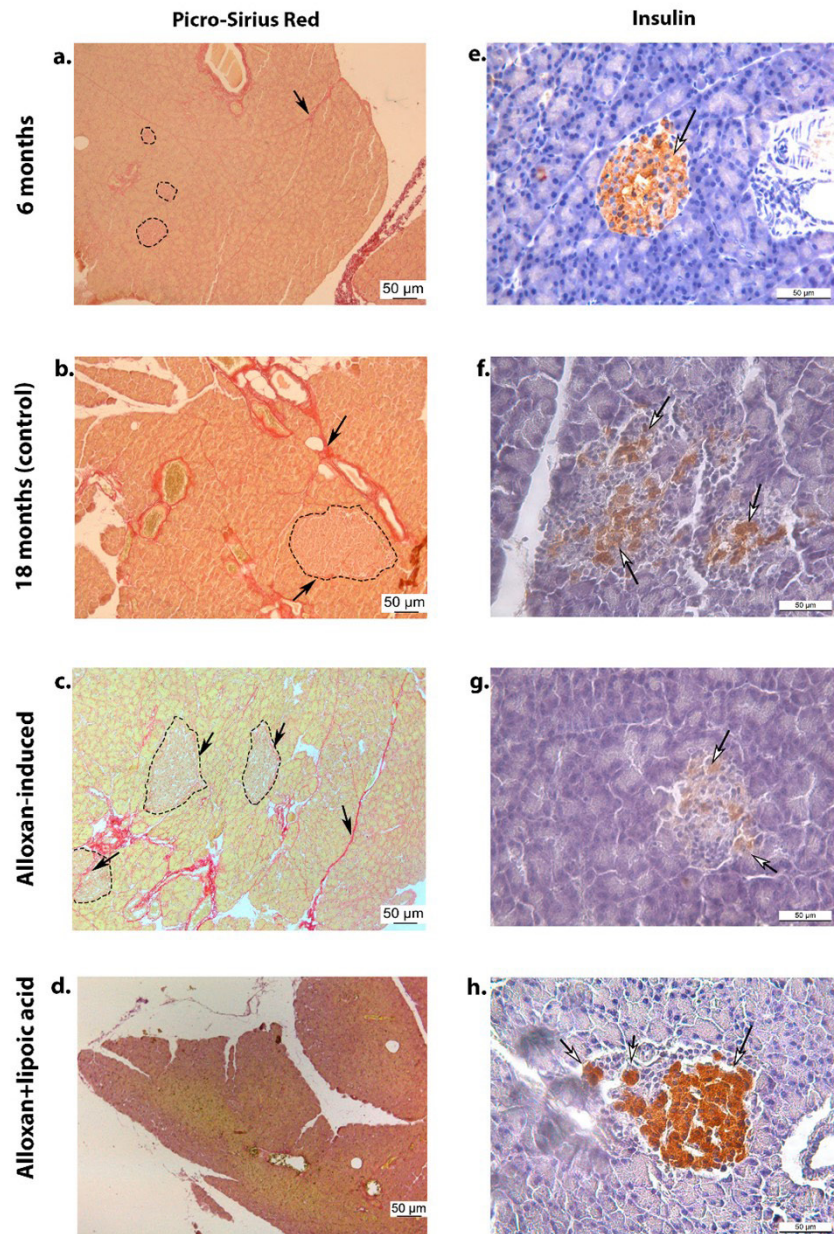


Рисунок 1. Микрофотографии поджелудочной железы крыс экспериментальных групп. Окраска Picro-Sirius Red. Увеличение  $\times 10$  (a – d). Островки обозначены пунктиром, черные стрелки указывают на коллагеновые волокна;

Иммуногистохимическое окрашивание панкреатических островков крыс на инсулин. Увеличение объектива 40x (e – h). Белые стрелки указывают на инсулин-позитивные клетки островков.

Молодые животные (a, e), старые животные (b, f), старые животные с аллоксановым диабетом (c, g), старые животные с аллоксановым диабетом и введением альфа-липоевой кислоты (d, h).

Figure 1. Microphotographs of rat pancreas of experimental groups. Picro-Sirius Red staining, 10x. (a – d). Dotted line indicates islets, black arrows indicate collagen fibers;

Immunohistochemical anti-insulin staining of rat pancreatic islets. Objective magnification 40x (e – h). White arrows indicate insulin positive cells.

Young rats (a, e), old rats (b, f), old animals with alloxan-induced diabetes (c, g), old animals with alloxan-induced diabetes and alfa-lipoic acid (d, h).

### Обсуждение результатов

Поджелудочная железа, как и другие органы, подвержена возрастным морфофункциональным изменениям, которые могут влиять на функциональную активность органа [18]. Результаты настоящего исследования свидетельствуют о развитии у пожилых крыс характерных биохимических и морфофункциональных изменений островкового аппарата поджелудочной железы, указывающих на наличие возрастной гиподисфункции. После введения аллоксана отмечается сочетание деструк-

тивных изменений в инсулин-продуцирующем аппарате с возрастными изменениями. При этом у животных обеих групп наблюдается увеличение площади островка преимущественно за счет разрастания в них соединительной ткани (фиброза). Считается, что одной из главных причин фиброгенеза при гипергликемии, возникшей на фоне СД, является усиление окислительного стресса [5]. Несмотря на то, что есть данные об успешном применении антиоксидантов для предотвращения диабетического фиброза в различных органах, отсутствуют исследования с применением АЛК в качестве терапевтического агента, направленного на снижение этого патологического состояния в поджелудочной железе [5, 19]. В рамках данного исследования обнаружен положительный эффект альфа-липоевой кислоты на морфофункциональное состояние эндокринного аппарата поджелудочной железы старых крыс и выраженность островкового фиброза. На фоне снижения гипергликемии животных отмечалась нормализация размеров панкреатических островков преимущественно за счет предотвращения фиброза, восстановление их функциональной активности за счет резкого увеличения количества инсулин-продуцирующих клеток. Это позволяет сделать вывод о том, что АЛК оказывает не только противодиабетическое, но и геропротекторное и антифиброгенное действие при формировании аллоксанового диабета у старых крыс.

### Выводы

Таким образом, для старых крыс в возрасте 18 месяцев характерно формирование состояния гипергликемии на фоне снижения количества инсулин-продуцирующих клеток островков Лангерганса, которое способствует увеличению островкового фиброза. Моделирование экспериментального сахарного диабета у старых крыс сопровождалось усугублением морфофункциональных изменений в островковом аппарате за счет снижения количества островков и их клеточности, а также резкого снижения массы бета-клеток, что усиливало состояние гипергликемии. Введение альфа-липоевой кислоты старым крысам с аллоксан-индуцированным диабетом улучшает функциональную активность островков благодаря увеличению как их количества и клеточности, так и доли бета-клеток в них, что, в свою очередь, приводит к снижению гипергликемии и островкового фиброза.

*Работа выполнена в рамках госзадания ИИФ УрО РАН (Регистрационный номер НИОКТР №122020900136-4) с использованием оборудования ЦКП ИИФ УрО РАН.*

### ЛИТЕРАТУРА

1. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas. 9th ed. Belgium: International Diabetes Federation, 2019. [https://www.diabetesatlas.org/upload/resources/material/20200302\\_133351\\_IDFATLAS9e-final-web.pdf](https://www.diabetesatlas.org/upload/resources/material/20200302_133351_IDFATLAS9e-final-web.pdf)
2. Kehm R, König J, Nowotny K., Jung T., Deubel S., Gohlke S. et al. Age-related oxidative changes in pancreatic islets are predominantly located in the vascular system. *Redox Biol.*, 2018, Vol. 15, pp. 387-93. DOI:10.1016/j.redox.2017.12.015.
3. Drigo R.A., Erikson G., Tyagi S., Capitanio Ju., Lyon J., Spigelman A.F. et al. Aging of human endocrine pancreatic cell types is heterogeneous and sex-specific. *BioRxiv*, 2019, p. 729541. DOI: 10.1101/72954.1.
4. Saisho Y., Butler A.E., Manesso E., Elashoff D., Rizza R.A., Butler P.C.  $\beta$ -cell mass and turnover in humans: effects of obesity and aging. *Diabetes Care*. 2013, Vol. 36, no. 1, pp. 111-17. DOI: 10.2337/dc12-0421.
5. Tuleta I., Frangogiannis N.G. Diabetic fibrosis. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis. Dis.* 2021, Vol. 1867, no. 4, pp. 166044. DOI: 10.1016/j.bbadis.2020.166044.
6. Zechner D., Knapp N., Bobrowski A., Radecke T., Genz B., Vollmar B. Diabetes increases pancreatic fibrosis during chronic inflammation. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. 2014, Vol. 239, no. 6, pp. 670-76. DOI: 10.1177/1535370214527890.
7. Zhao H.L., Lai F.M., Tong P.C., Zhong D.R., Yang D., Tomlinson B. et al. Prevalence and Clinicopathological Characteristics of Islet Amyloid in Chinese Patients with Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 2003, Vol. 52, no. 11, pp. 2759-66. DOI: 10.2337/diabetes.52.11.2759.
8. Hayden M.R. Islet amyloid and fibrosis in the cardiometabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *J. Cardiometab. Syndr.* 2007, Vol. 2, no. 1, pp. 70-5. DOI: 10.1111/j.1559-4564.2007.06159.x.

9. Ko S.H., Kwon H.S., Kim S.R., Moon S.D., Ahn Y.B., Song K.H. et al. Ramipril treatment suppresses islet fibrosis in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004, Vol. 316, no. 1, pp. 114-22. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.02.023.
10. Homo-Delarche F., Calderari S., Irminger J.C., Gangnerau M.N., Coulaud J., Rickenbach K. et al. Islet inflammation and fibrosis in a spontaneous model of type 2 diabetes, the GK rat. *Diabetes.* 2006, Vol. 55, no. 6, pp. 1625-33. DOI: 10.2337/db05-1526.
11. Lee E., Ryu G.R., Ko S., Ahn Y., Song K. A role of pancreatic stellate cells in islet fibrosis and  $\beta$ -cell dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017, Vol. 485, no. 2, pp. 328-34. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.02.082.
12. Можейко Л. А. Панкреатические звездчатые клетки: структура и функция. Часть 1. Морфофункциональная характеристика панкреатических звездчатых клеток в физиологических условиях // *Гепатология и гастроэнтерология.* – 2018. – Т. 2, №1. – С. 21-5. <http://hepatogastro.grsmu.by/index.php/journalHandG/article/view/58>
13. Тутельян В.А., Махова А.А., Погожева А.В., Ших Е.В., Елизарова Е.В., Хотимченко С.А. Липоевая кислота: физиологическая роль и перспективы клинического применения // *Вопросы питания.* – 2019. – Т. 88, №4. – С. 6-11. DOI: 10.24411/0042-8833-2019-10035.
14. Emelianov V.V., Leontev D.V., Ishchenko A.V., Bulavintseva T.S., Savateeva E.A., Danilova I.G. Atomic-force microscopy of erythrocytes and metabolic disorders in experimental diabetes mellitus and during the correction of diabetes with lipoic acid. *Biophysics.* 2016, Vol. 61, no. 6, pp. 906-10. DOI: 10.1134/S0006350916050067.
15. Tarte G.C., Florescu D.R., Mihailovici A.R., Donoiu I., Istrătoaie O. Alpha-lipoic acid and vitamin B complex slow down the changes in mice diabetic cardiomyopathy. *Rom. J. Morphol. Embryol.* 2020, Vol. 61, no. 2, pp. 521-28. DOI: 10.47162/RJME.61.2.22.
16. Данилова И.Г., Гетте И.Ф., Булавинцева Т.С. Способ моделирования аллоксанового диабета. Патент РФ, № 2534411, 2014. [https://yandex.ru/patents/doc/RU2534411C1\\_20141127](https://yandex.ru/patents/doc/RU2534411C1_20141127)
17. Hewitt S.M., Baskin D.G., Frevert C.W., Stahl W.L., Rosa-Molinar E. Controls for immunohistochemistry: the Histochemical Society's standards of practice for validation of immunohistochemical assays. *J Histochem. Cytochem.* 2014, Vol. 62, no. 10, pp. 693-97. DOI: 10.1369/0022155414545224.
18. Matsuda Y. Age-related pathological changes in the pancreas. *Front. Biosci. (Elite Ed.)*. 2018, Vol. 10, pp. 137-42. DOI: 10.2741/e813.
19. Lee E., Ryu G.R., Ko S.H., Ahn Y.B., Yoon K.H., Ha H. et al. Antioxidant treatment may protect pancreatic beta cells through the attenuation of islet fibrosis in an animal model of type 2 diabetes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011, Vol. 414, no. 2, pp. 397-402. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.09.087.

#### Авторы

Среднева Любовь Александровна

ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук»

Младший научный сотрудник лаборатории морфологии и биохимии

Российская Федерация, 620049, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, д. 106

lyubabio44@gmail.com

Клюева Юлия Николаевна

ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»

Старший преподаватель кафедры медицинской биохимии и биофизики

Российская Федерация, 620002, г. Екатеринбург, ул. Мира, д. 19

klueva.iulia@urfu.ru

Емельянов Виктор Владимирович

ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»

Кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры медицинской биохимии и биофизики

Российская Федерация, 620002, г. Екатеринбург, ул. Мира, д. 19

evvd@list.ru



Мухлынина Елена Артуровна

ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук»  
Кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории морфологии и биохимии  
Российская Федерация, 620049, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, д. 106  
elena.mukhlynina@yandex.ru

Гетте Ирина Федоровна

ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук»  
Кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории морфологии и биохимии  
Российская Федерация, 620049, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, д. 106  
i.goette@yandex.ru

Данилова Ирина Георгиевна

ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук»  
Доктор биологических наук, доцент, заведующая лабораторией морфологии и биохимии  
ig-danilova@yandex.ru

*L.A. Sredneva<sup>1</sup>, Ju.N. Kljueva<sup>2</sup>, V.V. Emelianov<sup>2</sup>, E.A. Mukhlynina<sup>1</sup>,  
I.F. Gette<sup>1</sup>, I.G. Danilova<sup>1</sup>*

## THE RELATIONSHIP BETWEEN THE MORPHOFUNCTIONAL STATE OF PANCREATIC INSULAR APPARATUS AND ISLET FIBROSIS IN OLD RATS UNDER ALLOXAN-INDUCED DIABETES AND ALPHA-LIPOIC ACID CORRECTION

<sup>1</sup> Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation;

<sup>2</sup> Ural Federal University named after the first President of Russia B. N. Yeltsin, Yekaterinburg, Russian Federation

**Abstract.** The scientific data on age-related changes in the insular apparatus of the pancreas are contradictory, including age-related insular fibrosis. There are some questions about the relationship between different pathomorphological changes in the insular apparatus and the possibility of their pharmacological correction with antioxidants, for example, alpha-lipoic acid, proved for treatment of diabetic cardiomyopathy and polyneuropathy. *The aim* of this study is to identify the relationship between the morphofunctional state of pancreatic insular apparatus and islet fibrosis in old rats with alloxan-induced diabetes and its correction using alpha-lipoic acid. *Materials and methods.* The experiment was conducted on 40 white male Wistar rats, which were divided into 4 groups: 1st — young intact animals 6 months old (n=10), 2nd — control group, old intact animals 18 months old (n=10), 3rd — old animals 18 months old with experimental diabetes (n=10), 4th — old animals 18 months old with experimental diabetes mellitus and administration of alpha-lipoic acid (n=10). Diabetes mellitus was designed with 3-times intraperitoneal injections of alloxan solution at a total dose of 170 µg/kg of animal weight. Alpha-lipoic acid was administered intramuscularly at a dose of 4 mg/100g of animal weight for 30 days. A morphological investigation of the pancreas was conducted, followed by immunohistochemical staining for insulin, as well as an assessment of the histotopographic localization of collagen. The obtained data were processed by mathematical statistics. *Results.* Decrease in the functionality of the pancreatic insular apparatus is due to a decrease in the number of beta-cells and an increase in fibrotic changes in it as a result of physiological aging, which was confirmed by an increase in the level of glucose in the blood plasma and a decrease in insulin expression in the islets. Alloxan diabetes exacerbated these changes. Administration of alpha-lipoic acid to aged animals with experimental diabetes contributed to an increase

in the number of islets, their cellularity, the content of islet beta cells and their insulin-producing activity, a decrease in blood glucose levels and the severity of fibrotic changes in the islets. **Conclusion.** In this study, it was shown for the first time that the administration of alpha-lipoic acid, which has an antioxidant capacity, caused a decrease in islet fibrosis in old animals with diabetes due to an increase in insulinocytes in the islet and a decrease in glucose concentration. Thus, alpha-lipoic acid has not only antidiabetic, but also geroprotective and antifibrogenic effects in old rats with alloxan-induced diabetes.

**Keywords:** pancreas, beta-cells, alloxan diabetes, islet fibrosis, alpha-lipoic acid

There is no conflict of interest.

Contact details of the corresponding author:

Elena A. Mukhlynina

elena.mukhlynina@yandex.ru

Received 14.05.2021

For citation:

Sredneva L.A., Kljueva Ju.N., Emelianov V.V., Mukhlynina E.A., Gette I.F., Danilova I.G. The relationship between the morphofunctional state of pancreatic insular apparatus and islet fibrosis in old rats under alloxan-induced diabetes and alpha-lipoic acid correction. *Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki. = Journal of Ural Medical Academic Science*. 2022, Vol. 19, no. 3, pp. 210–221. DOI: 10.22138/2500-0918-2022-19-3-210-221 (In Russ)

#### REFERENCES

1. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas*. 9th ed. Belgium: International Diabetes Federation, 2019. [https://www.diabetesatlas.org/upload/resources/material/20200302\\_133351\\_IDFATLAS9e-final-web.pdf](https://www.diabetesatlas.org/upload/resources/material/20200302_133351_IDFATLAS9e-final-web.pdf)
2. Kehm R, König J, Nowotny K., Jung T., Deubel S., Gohlke S. et al. Age-related oxidative changes in pancreatic islets are predominantly located in the vascular system. *Redox Biol.*, 2018, Vol. 15, pp. 387-93. DOI:10.1016/j.redox.2017.12.015.
3. Drigo R.A., Erikson G., Tyagi S., Capitanio Ju., Lyon J., Spigelman A.F. et al. Aging of human endocrine pancreatic cell types is heterogeneous and sex-specific. *BioRxiv*, 2019, p. 729541. DOI: 10.1101/729541.
4. Saisho Y., Butler A.E., Manesso E., Elashoff D., Rizza R.A., Butler P.C.  $\beta$ -cell mass and turnover in humans: effects of obesity and aging. *Diabetes Care*. 2013, Vol. 36, no. 1, pp. 111-17. DOI: 10.2337/dc12-0421.
5. Tuleta I., Frangogiannis N.G. Diabetic fibrosis. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis. Dis.* 2021, Vol. 1867, no. 4, pp. 166044. DOI: 10.1016/j.bbadis.2020.166044.
6. Zechner D., Knapp N., Bobrowski A., Radecke T., Genz B., Vollmar B. Diabetes increases pancreatic fibrosis during chronic inflammation. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. 2014, Vol. 239, no. 6, pp. 670-76. DOI: 10.1177/1535370214527890.
7. Zhao H.L., Lai F.M., Tong P.C., Zhong D.R., Yang D., Tomlinson B. et al. Prevalence and Clinicopathological Characteristics of Islet Amyloid in Chinese Patients with Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 2003, Vol. 52, no. 11, pp. 2759-66. DOI: 10.2337/diabetes.52.11.2759.
8. Hayden M.R. Islet amyloid and fibrosis in the cardiometabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *J. Cardiometab. Syndr.* 2007, Vol. 2, no. 1, pp. 70-5. DOI: 10.1111/j.1559-4564.2007.06159.x.
9. Ko S.H., Kwon H.S., Kim S.R., Moon S.D., Ahn Y.B., Song K.H. et al. Ramipril treatment suppresses islet fibrosis in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004, Vol. 316, no. 1, pp. 114-22. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.02.023.
10. Homo-Delarche F., Calderari S., Irminger J.C., Gangnerau M.N., Coulaud J., Rickenbach K. et al. Islet inflammation and fibrosis in a spontaneous model of type 2 diabetes, the GK rat. *Diabetes*. 2006, Vol. 55, no. 6, pp. 1625-33. DOI: 10.2337/db05-1526.
11. Lee E., Ryu G.R., Ko S., Ahn Y., Song K. A role of pancreatic stellate cells in islet fibrosis and  $\beta$ -cell dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017, Vol. 485, no. 2, pp. 328-34. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.02.082.

12. Mozhejko L. A. Pancreatic stellate cells: structure and function. Part 1. Morphofunctional characteristics of pancreatic stellate cells in physiological conditions. *Hepatology and gastroenterology*. 2018, Vol. 2, no. 1, pp. 21-5. <http://hepatogastro.grsmu.by/index.php/journalHandG/article/view/58> (in Russ)
13. Tutel'jan V.A., Mahova A.A., Pogozheva A.V., Shih E.V., Elizarova E.V., Hotimchenko S.A. Lipoic acid: physiological role and prospects for clinical use. *Problems of nutrition*. 2019, Vol. 88, no. 4, pp. 6-11. DOI: 10.24411/0042-8833-2019-10035. (in Russ)
14. Emelianov V.V., Leontev D.V., Ishchenko A.V., Bulavintseva T.S., Savateeva E.A., Danilova I.G. Atomic-force microscopy of erythrocytes and metabolic disorders in experimental diabetes mellitus and during the correction of diabetes with lipoic acid. *Biophysics*. 2016, Vol. 61, no. 6, pp. 906-10. DOI: 10.1134/S0006350916050067.
15. Tarte G.C., Florescu D.R., Mihailovici A.R., Donoiu I., Istrătoaie O. Alpha-lipoic acid and vitamin B complex slow down the changes in mice diabetic cardiomyopathy. *Rom. J. Morphol. Embryol*. 2020, Vol. 61, no. 2, pp. 521-28. DOI: 10.47162/RJME.61.2.22.
16. Danilova I.G., Gette I.F., Bulavintseva T.S. Method for simulating alloxan diabetes. Patent RF, № 2534411, 2014. [https://yandex.ru/patents/doc/RU2534411C1\\_20141127](https://yandex.ru/patents/doc/RU2534411C1_20141127) (in Russ)
17. Hewitt S.M., Baskin D.G., Frevert C.W., Stahl W.L, Rosa-Molinar E. Controls for immunohistochemistry: the Histochemical Society's standards of practice for validation of immunohistochemical assays. *J Histochem. Cytochem*. 2014, Vol. 62, no. 10, pp. 693-97. DOI: 10.1369/0022155414545224.
18. Matsuda Y. Age-related pathological changes in the pancreas. *Front. Biosci. (Elite Ed.)*. 2018, Vol. 10, pp. 137-42. DOI: 10.2741/e813.
19. Lee E., Ryu G.R., Ko S.H., Ahn Y.B., Yoon K.H., Ha H. et al. Antioxidant treatment may protect pancreatic beta cells through the attenuation of islet fibrosis in an animal model of type 2 diabetes. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2011, Vol. 414, no. 2, pp. 397-402. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.09.087.

#### Authors

Lyubov A. Sredneva

Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences  
Junior Researcher of the Laboratory of Morphology and Biochemistry  
106, Pervomaiskaya Str., Yekaterinburg, 620049, Russian Federation  
[lyubabio44@gmail.com](mailto:lyubabio44@gmail.com)

Yulia N. Klyueva

Ural Federal University named after the first President of Russia B. N. Yeltsin  
Senior lecturer at the Department of Medical Biochemistry and Biophysics  
19, Mira Str., Yekaterinburg, 620002, Russian Federation  
[klueva.iulia@urfu.ru](mailto:klueva.iulia@urfu.ru)

Victor V. Emelianov

Ural Federal University named after the first President of Russia B. N. Yeltsin  
Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Associate professor of the Department of Medical Biochemistry and Biophysics  
19, Mira Str., Yekaterinburg, 620002, Russian Federation  
[evvd@list.ru](mailto:evvd@list.ru)

Elena A. Mukhlynina

Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences  
Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher of the Laboratory of Morphology and Biochemistry  
106, Pervomaiskaya Str., Yekaterinburg, 620049, Russian Federation  
[elena.mukhlynina@yandex.ru](mailto:elena.mukhlynina@yandex.ru)

Irina F. Gette

Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences  
Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher of the Laboratory of Morphology and Biochemistry  
106, Pervomaiskaya Str., Yekaterinburg, 620049, Russian Federation  
i.goette@yandex.ru

Irina G. Danilova

Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences  
Dr. Sci. (Biol.), Associate Professor, Head of the Laboratory of Morphology and Biochemistry  
106, Pervomaiskaya Str., Yekaterinburg, 620049, Russian Federation  
ig-danilova@yandex.ru