

РОЛЬ ЛЕЙКОЦИТОВ В ПОВРЕЖДЕНИИ ПЕЧЕНИ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ САХАРНОГО ДИАБЕТА 1 И 2 ТИПА

Байкенова М.Б.^{1,2}, Соколова К.В.¹, Гетте И.Ф.¹, Данилова И.Г.¹

¹ ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук,
г. Екатеринбург, Россия

² ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»,
г. Екатеринбург, Россия

Резюме. Сахарный диабет – это метаболическое расстройство, которое возникает в результате недостаточной секреции инсулина и/или его действия, что в результате приводит к возникновению гипергликемии. Известно, что поражение печени является одним из распространенных осложнений сахарного диабета 2 типа (СД2) и нередко встречается при диабете 1 типа (СД1). Сравнение распределения лейкоцитов с различным фенотипом в ткани печени с показателями крови может стать основой для диагностики степени поражения печени и поиска методов коррекции деструктивных изменений в печени при сахарном диабете. На основании вышеизложенного целью данного исследования была оценка изменения маркеров поражения печени в крови и количества лейкоцитов (CD45⁺ клеток), Т-лимфоцитов (CD3⁺ клеток) и макрофагов в печени при экспериментальном сахарном диабете 1 и 2 типа. Эксперимент был выполнен на 30 крысах-самцах линии Wistar. Для моделирования СД1 использовали аллоксан в дозе 170 мг/кг массы тела. Для создания модели СД2 животным вводили стрептозотоцин и никотинамид в дозах 65 мг/кг и 110 мг/кг. Группой сравнения служили интактные животные. Были выполнены биохимические, гематологические, иммуногистохимические и морфометрические методы исследования. При моделировании СД1 и СД2 были получены близкие значения содержания глюкозы (соответственно, 10,88±0,47 ммоль/л и 10,78±0,42 ммоль/л) и гликированного гемоглобина (соответственно, 6,73±0,78% и 6,60±0,20%), превышающие значения интактных крыс (5,20±0,40 ммоль/л и 4,07±0,30%). В то же время увеличение общего количества лейкоцитов и фракции лимфоцитов периферической крови относительно нормы было более выраженным в группе СД2, чем в группе СД1. В печени крыс обеих диабетических групп обнаружено увеличение количества синусоидальных клеток, макрофагов, CD45⁺ клеток и CD3⁺ клеток относительно показателей интактной группы, но у крыс группы СД1 CD45⁺ клетки располагались в большем количестве в паренхиме печени, а у крыс группы СД2 – синусоидально. При сходной степени увеличения количества макрофагов и общего количества CD45⁺ клеток, было выявлено более значительное количество синусоидальных клеток и CD3⁺ клеток, расположенных как в паренхиме, так и периваскулярно, у крыс группы СД2 по сравнению с показателем группы СД1. Увеличение активности АЛТ подтверждает более значительное повреждение клеток печени у животных группы СД2, тогда как в группе СД1 повышенная активность АСТ и менее выраженное увеличение активности АЛТ свидетельствуют о цитолизе без преимущественной локализации. Результаты исследования показали, что, несмотря на сходный уровень гипергликемии, воспалительный процесс на уровне целого организма и местный

Адрес для переписки:

Байкенова Мадина Багатчановна
ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии»
Уральского отделения Российской академии наук,
620049, Россия, г. Екатеринбург,
ул. Первомайская, 106.
Тел.: 8 (912) 288-94-70.
E-mail: m.b.baikenova@urfu.ru

Address for correspondence:

Baykenova Madina B.
Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch,
Russian Academy of Science
620049, Russian Federation, Yekaterinburg,
Pervomaiskaya str., 106.
Phone: 7 (912) 288-94-70.
E-mail: m.b.baikenova@urfu.ru

Образец цитирования:

М.Б. Байкенова, К.В. Соколова, И.Ф. Гетте,
И.Г. Данилова «Роль лейкоцитов в повреждении
печени при моделировании сахарного диабета 1 и 2
типа» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 2.
С. 263–272. doi: 10.15789/1563-0625-ROL-2368
© Байкенова М.Б. и соавт., 2022

For citation:

M.B. Baykenova, K.V. Sokolova, I.F. Gette, I.G. Danilova
“Role of leucocytes in liver damage in experimental models
of type 1 and 2 diabetes mellitus”, Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 2,
pp. 263–272. doi: 10.15789/1563-0625-ROL-2368
DOI: 10.15789/1563-0625-ROL-2368

воспалительный процесс в печени более выражен в группе СД2, и более значительная выраженность воспалительного процесса и повреждения печени соответствует увеличению синусоидальных клеток и инфильтрации печени CD3⁺ клетками.

Ключевые слова: сахарный диабет, печень, повреждение, лейкоциты, лимфоциты, макрофаги

ROLE OF LEUCOCYTES IN LIVER DAMAGE IN EXPERIMENTAL MODELS OF TYPE 1 AND 2 DIABETES MELLITUS

Baykenova M.B.^{a, b}, Sokolova K.V.^a, Gette I.F.^a, Danilova I.G.^a

^a Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Science, Yekaterinburg, Russian Federation

^b B. Yeltsin Ural Federal University, Yekaterinburg, Russian Federation

Abstract. Diabetes mellitus is a metabolic disorder, which results from insufficient secretion of insulin and/or its action, thus leading to hyperglycemia. Liver damage is known to be among the most common complications of type 2 diabetes mellitus (T2D) and is common in T1D. Comparison of the leukocyte phenotypes in liver tissue with appropriate blood parameters may assess degree of liver damage and search for approaches to correction of liver destruction in diabetes mellitus. Therefore, we aimed for assessment of changes in liver injury markers in blood and the numbers of leucocytes (CD45⁺ cells), T lymphocytes (CD3⁺ cells) and macrophages in the liver in experimental models of types 1 and 2 diabetes. The experiment was conducted on 30 male Wistar rats. Alloxan at the dose of 170 mg/kg of body weight was used for T1D modeling. To provide a model of T2D, streptozotocin and nicotinamide were injected at the doses of 65 mg/kg, and 110 mg/kg respectively. Intact animals were used as a comparison control. Biochemical, hematological, immunohistochemical and morphometrical methods were used in the study. In T1D and T2D groups, levels of glucose (10.88±0.47 mmol/l and 10.78±0.42 mmol/l) and glycosylated hemoglobin (6.73±0.78% and 6.60±0.20% correspondingly) were rather close to each other and exceeded the values of intact rats (5.20±0.40 mmol/l and 4.07±0.30%). At the same time, the increase in total leucocyte number and fraction of peripheral blood leucocytes against normal levels were more pronounced in the T2D group than in T1D group. In liver of rats from the both diabetic groups, increased numbers of sinusoidal cells, macrophages, CD45⁺ cells and CD3⁺ cells relative to intact rats were detected. However, in rats from T1D group, CD45⁺ cells were distributed, mainly, in the liver parenchyma, whereas in rats in T2D group they showed sinusoidal location. At a similar degree of increasing macrophage numbers, and total CD45⁺ cells number, higher counts of sinusoidal cells and CD3⁺ cells, located both in the parenchyma and perivascular area, were found in rats of T2DM group compared with this parameter in T1DM group. An increase in ALT activity confirms a more significant damage to liver cells in animals of the T2DM group, whereas, in T1DM group, an increased AST activity and a less pronounced increase in ALT activity indicate uniformly distributed cytolysis. The results of our study showed, that, despite similar hyperglycemia level, the inflammatory process at the level of the whole organism and local inflammatory process in the liver are more pronounced in the T2DM group. A more significant severity of inflammatory process and liver damage corresponds to increase in sinusoidal cells and CD3⁺ cell infiltration of liver tissue.

Keywords: diabetes mellitus, liver, damage, leukocytes, lymphocytes, macrophages

Введение

Сахарный диабет (СД) сопровождается нарушением углеводного, белкового и липидного обмена, развитием хронических осложнений и поражением всех органов и систем организма, в том числе и печени [1, 5]. Поражение печени у больных СД описывают как неалкогольную жировую болезнь печени, которая характеризуется такими состояниями как стеатоз, стеатогепатит и, по дан-

ным разных авторов, обнаруживается у 35-100% больных сахарным диабетом 2 типа (СД2) [6, 8, 15, 24] и у 8,8-30% больных сахарным диабетом 1 типа (СД1) [11, 23]. У больных СД2 неалкогольную жировую болезнь печени связывают с метаболическим синдромом. При отсутствии лечения стеатоз прогрессирует, осложняется фиброзом и развитием цирроза печени, реже – гепатоцеллюлярной карциномы [14].

Печень ответственна за поддержание уровня аминокислот, белков, липидов, глюкозы в крови. В печени синтезируются липопротеиды очень низкой и высокой плотности (ЛПОНП и ЛПВП), необходимые для транспорта триацилглицеринов и холестерина. Печень секретирует большинство белков крови, в том числе белки острой фазы, хемокины и цитокины, а также содержит разнообразные популяции резидентных иммунных клеток [17]. Для регуляции гомеостаза глюкозы в печени осуществляется гликолиз, гликогенолиз, гликогенез, глюконеогенез [10]. В то же время поступление глюкозы в клетки печени зависит от инсулина, способствующего встраиванию транспортера глюкозы Glut-4 в наружную цитоплазматическую мембрану. При абсолютной или относительной недостаточности инсулина недоступность глюкозы для инсулинзависимых органов, в том числе печени, вызывает усиление липолиза в результате действия контринсулярных гормонов.

В механизме развития жирового перерождения печени при диабете выделяют два этапа. На первом этапе увеличивается поступление высвободившихся при липолизе свободных жирных кислот в гепатоциты и звездчатые клетки, снижается скорость β -окисления жирных кислот в митохондриях этих клеток, также уменьшается удаление из гепатоцитов ЛПОНП, содержащих значительное количество триацилглицеринов, что приводит к увеличению липидных вакуолей [6, 8, 12]. На втором этапе усиливается свободнорадикальное окисление жирных кислот, являющихся объектом атаки активных форм кислорода. Кроме того, избыток глюкозы в крови при СД является прооксидантным фактором. Развивается оксидативный стресс, способствующий разрушению мембран и гибели гепатоцитов посредством некроза или апоптоза [6, 8, 16]. Известно, что окислительный стресс в печени при СД активирует транскрипцию проапоптотических генов [21] и сопровождается увеличением проапоптотических факторов, таких как каспаза-3 [18].

В печени при СД, как и в остальных органах, в ответ на высвобождение метаболитов из погибших клеток и гликирование белков развивается воспалительная реакция. Исследования последних лет свидетельствуют о наличии аутоиммунной агрессии в отношении β -клеток при СД1 и инсулиновых рецепторов при СД2 в начале заболевания и о повсеместных аутоиммунных реакциях в последующем [1].

В ответ на повреждение в печени развиваются компенсаторные восстановительные процессы. Воспаление в печени может как усугублять тяжесть течения заболевания, так и ограничить

степень поражения гепатоцитов, что способствует восстановлению поврежденных структур и способствует восстановлению гомеостаза [16, 22]. При ускоренном повреждении клеток печени, опережающем восстановительный рост, усиливается отложение элементов соединительной ткани, замещающих потерю гепатоцитов, что приводит к развитию фиброза. Процессы разрушения печени и процессы регенерации регулируются резидентными иммунокомпетентными клетками (клетками Купфера, тучными клетками) и лейкоцитами, в том числе моноцитами, поступающими в печень в ответ на вырабатываемые клетками Купфера хемоаттрактанты [22]. Деструктивные процессы в печени осуществляются нейтрофилами, различными фракциями Т-лимфоцитов, инфильтрующими ткань печени, при посредстве провоспалительных цитокинов, таких как TNF α , IL-1, IL-6 [8, 14, 16].

Биопсия печени является «золотым стандартом» для диагностики стеатоза [15], но чаще в клинике определяют активность аминотрансфераз и щелочной фосфатазы, спектр липидов и провоспалительные факторы [16]. В эксперименте у крыс со стрептозотоциновым СД1 также обнаружено увеличение активности аминотрансфераз, щелочной фосфатазы, провоспалительных цитокинов, С-реактивного белка, TNF α , IL-6 и продукта свободнорадикального окисления – малонового диальдегида (MDA) [12, 18]. Изменение количества различных фракций лейкоцитов периферической крови может свидетельствовать о воспалительном процессе при СД на уровне целого организма и печени, в частности соотношение фракций нейтрофилов и лимфоцитов используют для оценки степени стеатоза [13]. Сравнение показателей печеночного профиля в крови с распределением лейкоцитов в печени может иметь диагностическое значение, но оценка инфильтрации печени лейкоцитами доступна преимущественно в эксперименте. Выяснение роли лейкоцитов в процессах повреждения и восстановления печени может стать основой для поиска способов коррекции деструктивных изменений в печени при СД, однако локализация лейкоцитов в паренхиме печени и в пространстве вокруг сосудов исследована недостаточно. Сравнению особенностей поражения печени при СД1 и СД2 также уделяется мало внимания [11], поражение печени исследуется преимущественно при СД2 [6, 8, 13, 15, 16], и одиночные исследования проводятся при СД1 [12, 23].

Цель работы – оценить изменение маркеров поражения печени в крови и количества лейкоцитов (CD45⁺ клеток), Т-лимфоцитов (CD3⁺ клеток) и макрофагов в печени при экспериментальном сахарном диабете 1 и 2 типа.

Материалы и методы

Экспериментальные животные

Эксперимент был выполнен на 30 крысах-самцах линии Wistar массой 300-340 г 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.) и одобрен этическим комитетом Института иммунологии и физиологии УрО РАН (Протокол № 04/19 от 18.12.2019). Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП ИИФ УрО РАН.

Индукция диабета и экспериментальные группы

Были сформированы следующие экспериментальные группы животных: 1 — интактная, 2 — животные с аллоксановой моделью сахарного диабета 1 типа (СД1), 3 — животные со стрептозотоцин-никотинамидной моделью сахарного диабета 2 типа (СД2). Для создания модели СД1 использовали аллоксан, разведенный в 0,85% растворе хлорида натрия, который вводили внутривентриально в суммарной дозе 170 мг/кг массы тела животного по модифицированной авторской методике [3]. Для моделирования СД2 животным вводили внутривентриально стрептозотоцин, разведенный в цитратном буфере в дозе 65 мг/кг массы тела животного, с предварительным (за 15 минут) внутривентриальным введением водного раствора никотинамида в дозе 110 мг/кг массы тела животного [7]. Животных выводили из эксперимента на 30-е сутки после индукции диабета. Перед выведением животные были лишены пищи за 12 часов до эксперимента, доступ к воде оставляли свободным. Предварительно у крыс брали кровь из хвостовой вены для верификации воспроизведения моделей СД.

Анализ крови

В плазме крови крыс определяли содержание инсулина, глюкозы, HbA_{1c}, общего количества белка, а также активность ферментов: аспаратаминотрансферазы или АСТ (К.Ф.2.6.1.1), аланинаминотрансферазы или АЛТ (К.Ф.2.6.1.2), щелочной фосфатазы или ЩФ (К.Ф.3.1.3.1). Для определения биохимических тестов использовали наборы реактивов фирмы «Витал Диагностикс» (Санкт-Петербург). Содержание гликированного гемоглобина (HbA_{1c}) в цельной крови определяли методом аффинной гель-хроматографии с использованием набора ГЛИКОГЕМОТЕСТ («ЭЛТА», Российская Федерация), оптическую плотность измеряли спектрофотометром DU-800 (Beckman, США). Методом иммуноферментного анализа в плазме крови определяли содержание инсулина (набор реактивов Rat/Mouse Insulin ELISA, Millipore, США).

Использовали иммуноферментный анализатор LAZURITE AUTOMATED ELISA SYSTEM (Dyner Technologies, США).

Общий анализ в крови, взятой из хвостовой вены, выполняли на автоматическом гематологическом анализаторе Celly 70 Biocode Hysel, предназначенном для анализа в экспериментах и ветеринарии.

Гистологические и иммуногистохимические исследования

После проведения срединной лапаротомии у животных извлекали печень. Фрагменты ткани фиксировали в 10%-ном водном растворе нейтрального формалина в течение 24 часов. После восьмичасовой промывки материал подвергали стандартной гистологической проводке в автоматизированном тканевом процессоре Leica TP 1020 (Leica Microsystems, Германия). Срезы изготавливали на микротоме Leica SM 2000R (Leica Microsystems, Германия) толщиной 3-4 мкм.

Имуногистохимическое исследование печени осуществляли на парафиновых срезах. Для оценки экспрессии CD3 применяли первичные антитела Purified Mouse Anti-Rat CD3 клон G 4.18 (BD Pharmingen, США) и CD45 Purified Mouse Anti-Rat CD45 клон OX-1 (BD Pharmingen, США), которые в разведении 1:30 инкубировали в течение 60 минут при комнатной температуре, а затем вторичные антитела Biotin Goat Anti-Mouse Ig (Multiple Adsorption) (BD Biosciences, США) в разведении 1:500. Антигенреактивные клетки выявляли при помощи тест-системы Novolink™ Polymer Detection System (Novocastra Lab., Ltd), контрастируя их хромогенным субстратом (3,3'-диаминобензидин в буферном растворе). DAB-позитивные клетки идентифицировали по коричневому окрашиванию цитоплазмы клеток. Проводили негативный и изотипический контроль, оценивая в срезах количество клеток с различной интенсивностью положительной ИГХ-реакции. Микроскопическое исследование проводили на микроскопе Leica DM 2500 (Leica, Germany) с видеокамерой Leica DFC420, анализ изображений выполняли в программе Leica Application Suite (V4) (Leica, Germany). Количественную оценку CD3⁺ и CD45⁺ клеток производили в единице площади в 20 полях зрения при увеличении микроскопа ×1000.

Статистический анализ

Статистический анализ результатов выполнен с использованием программного обеспечения OriginPro 2018 software (OriginLab Corporation, США) и непараметрического критерия Манна-Уитни и Краскела-Уоллиса ($p < 0,05$). Данные представлены в виде среднего \pm ошибки среднего ($M \pm m$).

Результаты

При определении концентрации глюкозы и HbA_{1c} в крови было показано, что у животных с экспериментальными моделями СД1 и СД2 по сравнению с аналогичными показателями интактной группы увеличивается в одинаковой степени концентрация не только глюкозы, но и HbA_{1c}.

Уровень инсулина в группе СД1 снижается по сравнению с показателем здоровых крыс, тогда как у животных с экспериментальным СД2 содержание инсулина остается на уровне показателя интактной группы (табл. 1).

При оценке активности ферментов зафиксировано увеличение активности АЛТ у диабетических крыс относительно нормы, у животных с экспериментальным СД 2 типа увеличение этого показателя было более выражено, чем в группе СД1 (табл. 1). Повышение активности АЛТ у животных с моделью СД2 влечет за собой снижение коэффициента де Ритиса. У животных с аллоксановой моделью СД1 отмечается повышение уровня АСТ относительно показателя интактной группы, тогда как в группе СД2 данный показатель остается на уровне здоровых крыс.

У крыс со стрептозотоцин-никотинамидной моделью СД2 и аллоксановой моделью СД1 не выявлено достоверных изменений активности щелочной фосфатазы относительно значения

показателя здоровых животных (табл. 1). Зафиксировано уменьшение количества общего белка в плазме крови крыс с обеими моделями СД в сравнении с показателем интактной группы; в группе СД1 снижение уровня белка было выражено в большей степени, чем в группе СД2 (табл. 1).

Установлено увеличение как общего количества лейкоцитов, так и фракций лимфоцитов и гранулоцитов в периферической крови крыс с моделью диабета 1 и 2 типа по сравнению с показателями интактных животных (табл. 2). У животных группы СД2 общее количество лейкоцитов и лимфоцитарная фракция увеличились в большей степени, чем в группе СД1. В то же время не изменилось в крови животных в группах СД1 и СД2 содержание средних клеток, включающих преимущественно моноциты, а также некоторое количество базофилов, эозинофилов и незрелых клеток (табл. 2).

Результаты иммуногистохимического исследования показали, что моделирование СД у животных сопровождается увеличением количества CD45⁺ клеток почти в 2,7 раза как при СД1, так и при СД2. Отмечается увеличение числа данных клеток, расположенных периваскулярно и в паренхиме органа. При СД1 количество CD45⁺ клеток, локализующихся в паренхиме печени и периваскулярно превышает данный показатель интактной группы в 3,7 и 1,7 раза соответственно. У группы с СД2 число CD45⁺ клеток, распо-

ТАБЛИЦА 1. БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ В КРОВИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

TABLE 1. BLOOD BIOCHEMICAL PARAMETERS IN EXPERIMENTAL ANIMALS

Показатель / Группа Parameter / Group	Интактная Intact	СД1 T1DM	СД2 T2DM
Глюкоза, ммоль/л Glucose, mmol/L	5,20±0,40	10,88±0,47*	10,78±0,42*
НbA _{1c} , %	4,07±0,30	6,73±0,78*	6,60±0,20* #
Инсулин, мкг/л Insulin, mkg/L	1,28±0,19	0,50±0,09*	1,00±0,13#
АСТ, мкмоль/мин × л AST, mkmol/min × L	16,5±1,0	21,0±1,0*	16,4±0,8#
АЛТ, мкмоль/мин × л ALT, mkmol/min × L	12,9±0,9	16,3±1,1*	23,1±1,5* #
АСТ/АЛТ AST/ALT	1,29±0,06	1,30±0,06	0,73±0,07* #
ЩФ, мкмоль/мин × л ALP, mkmol/min × L	69,7±3,9	63,4±11,0	65,0±12,5
Общий белок, г/л Total protein, g/L	72,0±2,7	59,1±1,6*	68,6±3,8* #

Примечание. * – различие по сравнению с показателем контроля (p < 0,05); #, различие по сравнению с показателем группы СД1 (p < 0,05).

Note. * – significant difference with control group (p < 0.05); # – significant difference with the T1D group (p < 0.05).

ТАБЛИЦА 2. ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

TABLE 2. HEMATOLOGICAL PARAMETERS OF EXPERIMENTAL ANIMALS

Показатель / Группа Parameter / Group	Интактная Intact	СД1 T1DM	СД2 T2DM
Лейкоциты, тысяч/мкл Leukocytes, thousand/ μ L	7,68 \pm 0,42	11,31 \pm 0,23*	14,54 \pm 1,29* #
Лимфоциты, тысяч/мкл Lymphocytes, thousand/ μ L	4,67 \pm 0,42	5,93 \pm 0,25*	9,33 \pm 0,94* #
Средние клетки, тысяч/мкл Average cells, thousand/ μ L	0,77 \pm 0,23	1,10 \pm 0,11	1,44 \pm 0,22
Гранулоциты, тысяч/мкл Granulocytes, thousand/ μ L	2,25 \pm 0,25	4,28 \pm 0,26*	3,77 \pm 0,40*

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ТАБЛИЦА 3. КОЛИЧЕСТВО СИНУСОИДАЛЬНЫХ КЛЕТОК, МАКРОФАГОВ И ЛИМФОЦИТОВ С РАЗНЫМ ИММУНОФЕНОТИПОМ В ПЕЧЕНИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

TABLE 3. NUMBER OF SINUSOIDAL CELLS, MACROPHAGES AND LYMPHOCYTES WITH DIFFERENT IMMUNOPHENOTYPES IN THE LIVER OF EXPERIMENTAL ANIMALS

Показатель / Группа Parameter / Group	Интактная Intact	СД1 T1DM	СД2 T2DM
Количество синусоидальных клеток, N/мм ² Sinusoidal cells, N/mm ² liver section	387,1 \pm 14,2	645,2 \pm 34,0*	713,2 \pm 33,5* #
Количество макрофагов, N/мм ² Macrophages, N/mm ² liver section	116,1 \pm 2,2	204,0 \pm 8,3*	213,9 \pm 9,5*
Общее количество CD45 ⁺ клеток, N/мм ² среза печени, % Total number of CD45 ⁺ cells, N/mm ² liver section	27,16 \pm 1,73	72,80 \pm 1,75*	74,10 \pm 2,37*
Количество CD45 ⁺ клеток, расположенных в паренхиме N/мм ² , % CD45 ⁺ cells, located in liver parenchyma, N/mm ² liver section, %	11,83 \pm 1,59 (43,56%)	46,89 \pm 1,51* (64,40%)	42,90 \pm 1,77* # (57,9%)
Количество CD45 ⁺ клеток, расположенных периваскулярно, N/мм ² , % Perivascular located CD45 ⁺ cells, N/mm ² liver section, %	15,33 \pm 2,30 (56,44%)	25,91 \pm 0,70* (35,59%)	31,20 \pm 2,13* # (42,10%)
Общее количество CD3 ⁺ клеток, N/мм ² среза печени Total number of CD3 ⁺ cells, N/mm ² liver section	5,20 \pm 1,16	26,65 \pm 1,15*	42,90 \pm 1,16* #
Количество CD3 ⁺ клеток, расположенных в паренхиме N/мм ² , % CD3 ⁺ cells, located in liver parenchyma, N/mm ² liver section, %	1,30 \pm 1,16 (25%)	12,35 \pm 1,32* (46,34%)	19,50 \pm 1,12* # (45,45%)
Количество CD3 ⁺ клеток, расположенных периваскулярно, N/мм ² , % Perivascular located CD3 ⁺ cells, N/mm ² liver section, %	3,90 \pm 1,83 (75%)	14,30 \pm 1,68* (53,66%)	23,40 \pm 1,42* # (54,54%)

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ложенных вокруг сосудов и в паренхиме органа выше в 3,6 и 2 раза по сравнению с аналогичными показателями здоровых крыс (табл. 3).

При подсчете CD3⁺ клеток на фоне моделирования СД 1 и 2 типа установлено увеличение их количества по сравнению со значением интактной группы. Так, при СД1 количество CD3⁺ клеток, расположенных в паренхиме печени и периваскулярно, выше данного показателя интактной группы в 9,5 и 3,6 раза соответственно. В печени животных с СД 2 типа число CD3⁺ клеток, локализованных в паренхиме печени и вокруг сосудов, больше аналогичного показателя здоровых животных в 15 и 8,2 раза соответственно (табл. 3).

Обсуждение

Повышение в крови уровня глюкозы и HbA1c подтверждает развитие СД у экспериментальных животных, а накопление гликированного гемоглобина свидетельствует о состоянии гипергликемии в течение не менее чем четырех недель [1]. Несмотря на сходное увеличение содержания глюкозы и HbA1c, многие исследованные параметры отличаются в группах крыс с диабетом 1 и 2 типа. Так, полученное различие в содержании инсулина соответствует моделированию СД1 и СД2.

Установленное в эксперименте возрастание активности АЛТ у животных с моделированием диабета 1 и 2 типа подтверждается данными литературы, которые свидетельствуют об ассоциации повышенной активности АЛТ с развитием СД [20], а снижение коэффициента де Ритиса является маркером повреждения и некроза гепатоцитов [4]. Более выраженное увеличение активности АЛТ и уменьшение коэффициента де Ритиса в группе СД2 может быть ассоциировано с гибелью большего количества гепатоцитов, чем в группе СД1. Повышение активности АСТ обнаружено только у животных с аллоксановой моделью диабета, может отражать изменения проницаемости мембран не только гепатоцитов, но также кардиомиоцитов и других клеток.

Отсутствие изменения активности щелочной фосфатазы в обеих группах диабетических крыс исключает развитие холестатического синдрома.

Более выраженная гипопроотеинемия у крыс с экспериментальным СД1 по сравнению группой СД2 указывает на более значительное нарушение белоксинтетической функции печени у животных при моделировании СД1.

Более выраженная гипопроотеинемия у крыс с экспериментальным СД1 по сравнению группой СД2 указывает на более значительное нарушение белоксинтетической функции печени у животных при моделировании СД1.

Увеличение общего количества лейкоцитов, лимфоцитарной и гранулоцитарной фракций в периферической крови диабетических крыс свидетельствует об активации неспецифических и специфических иммунных реакций, обуславливающих аутоиммунную агрессию и воспалительный процесс в печени и других органах [13].

Воспалительный процесс, вероятно, более выражен в печени крыс группы СД2, что согласуется с обнаруженной более высокой активностью АЛТ в этой группе по сравнению с СД1. Отсутствие достоверных изменений фракции средних клеток в крови может быть связано с переходом в поджелудочную железу, печень и другие органы значительной части моноцитов, дифференцирующихся в органах в макрофаги. Так, увеличение количества синусоидальных клеток, содержащих не менее 40% макрофагов, было установлено в эксперименте с моделированием аллоксанового диабета 1 типа [2], а также было выявлено увеличение инфильтрации печени макрофагами у мышей с СД2, полученным в результате жировой диеты [19].

Известно, что в повреждении печени участвуют все синусоидальные клетки, включающие эндотелиальные клетки, клетки Купфера, звездчатые и ямочные клетки, но ведущая роль принадлежит Купферовским клеткам (резидентным макрофагам), которые активно фагоцитируют апоптотические гепатоциты и фрагменты разрушенных клеток, презентуют аутоантигены, вырабатывают активные формы кислорода, провоспалительные цитокины и хемоаттрактанты, привлекающие лейкоциты крови. Активация резидентных макрофагов сопровождается поступлением в печень полиморфноядерных лейкоцитов, Т-лимфоцитов и мононуклеаров. Последние дифференцируются в макрофаги, которые могут усугублять деструкцию или способствовать восстановительному росту в зависимости от их фенотипа. Увеличение количества синусоидальных клеток происходит за счет инфильтрации печени лейкоцитами, имеющими общий антиген CD45⁺.

Согласно данным литературы, гипергликемия приводит к развитию низкоинтенсивного системного хронического воспаления [9, 13]. Проведенное исследование лейкоцитов периферической крови диабетических крыс свидетельствует о воспалительном процессе на уровне целого организма, а иммуногистохимическое исследование печени показало наличие воспалительного процесса в печени, так как при моделировании СД 1 и 2 типа в печени животных резко возрастает количество CD45⁺ клеток – различных фракций лейкоцитов. Увеличенное абсолютное и относительное количество данных клеток обнаруживается как периваскулярно, так и в паренхиме

органа, что отражает экссудативную фазу воспаления. При моделировании СД 1 типа накопление CD45⁺ клеток несколько более выражено в паренхиме печени, чем вокруг сосудов, в отличие от печени крыс с СД2, где наблюдается обратное соотношение. Вместе с тем, у групп с СД1 и СД2 увеличивается количество CD3⁺ клеток, локализованных вокруг сосудов и в паренхиме органа, что характеризует наличие воспалительной реакции в органе, опосредованной Т-лимфоцитами, проявляющимися цитотоксичность.

В группе СД2 общее количество синусоидальных клеток и количество CD3⁺ клеток в целом и расположенных в паренхиме и периваскулярно превышает показатели группы СД1. Более существенная инфильтрация CD3⁺ лейкоцитами печени крыс с моделью СД2 соответствует большему количеству лейкоцитов и лимфоцитов в периферической крови и большей степени выраженности цитолитического синдрома, подтвержденного повышением активности АЛТ и снижением коэффициента де Ритиса.

Заключение

1. Моделирование сахарного диабета 1 и 2 типа с равной степенью гипергликемии сопровождается развитием воспалительного процесса на уровне целого организма и местного воспалительного процесса в ткани печени, более выраженного при моделировании СД2.

2. При моделировании обоих типов СД воспалительная реакция в ткани печени сопровождается резким увеличением количества CD45⁺ клеток, в большем количестве обнаруженных в паренхиме печени животных СД1 и вокруг сосудов в печени животных СД2.

3. Большее количество синусоидальных клеток и более значительная инфильтрация CD3⁺ лейкоцитами печени крыс с моделью СД2 соответствует большему количеству лейкоцитов и лимфоцитов в периферической крови и большей степени выраженности цитолитического синдрома в этой группе.

Список литературы / References

1. Балаболкин М.И., Клебанова Е.М., Кремская В.М. Лечение сахарного диабета и его осложнений (руководство для врачей). М.: Медицина, 2005. 512 с. [Balabolkin M.I., Klebanova E.M., Kreminskaya V.M. Treatment of diabetes mellitus and its complications (a guide for doctors)]. Moscow: Meditsina, 2005. 512 p.
2. Данилова И.Г., Блинкова Н.Б., Гетте И.Ф., Пьянкова З.А., Белоусова А.В., Абидов М.Т. Влияние активации макрофагов на морфофункциональное состояние тучных клеток печени крыс с аллоксановым диабетом // Российский иммунологический журнал, 2016. Т. 10 (19), № 3. С. 244-246. [Danilova I.G., Blinkova N.B., Gette I.F., Pyankova Z.A., Belousova A.V., Abidov M.T. The effect of macrophage activation on the morphofunctional state of liver mast cells in rats with alloxan diabetes. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2016, Vol. 10 (19), no. 3, pp. 244-246. (In Russ.)]
3. Данилова И.Г., Гетте И.Ф. Способ моделирования аллоксанового диабета. Патент на изобретение № 2534411; 2014. [Danilova I.G., Gette I.F. Method for modeling alloxan diabetes. Patent RF. No. 2534411; 2014].
4. Журавлева Л.В., Огнева Е.В. Инсулиноподобный фактор роста-1, цитоллиз и холестаз у больных неалкогольной жировой болезнью печени и при ее сочетании с сахарным диабетом 2-го типа // Клиницист, 2013. Т. 3, № 4. С. 48-52. [Zhuravleva L.V., Ogneva E.V. Insulin-like growth factor-1, cytolysis and cholestasis in patients with non-alcoholic fatty liver disease and in its combination with type 2 diabetes mellitus. *Klinitsist = Clinician*, 2013, Vol. 3, no. 4, pp. 48-52. (In Russ.)]
5. Калмыкова З.А., Кононенко И.В., Майоров А.Ю. Сахарный диабет и хронические заболевания печени. Часть 1: общие механизмы этиологии и патогенеза // Терапевтический архив, 2019. Т. 91, № 10. С. 106-111. [Kalmukova Z.A., Kononenko I.V., Mayorov A.Yu. Diabetes mellitus and chronic liver disease. Part 1: general mechanisms of etiology and pathogenesis. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive*, 2019, Vol. 91, no. 10, pp. 106-111. (In Russ.)]
6. Петунина Н.А., Тельнова М.Э. Неалкогольная жировая болезнь печени при сахарном диабете 2-го типа // Медицинский совет, 2016. № 4. С. 92-95. [Petunina N.A., Telnova M.E. Non-alcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes mellitus. *Meditsinskiy sovet = Medical Council*, 2016, no. 4, pp. 92-95. (In Russ.)]
7. Спасов А.А., Воронкова М.П., Сингур Г.Л., Чепляева Н.И., Чепурнова М.В. Экспериментальная модель сахарного диабета типа 2 // Биомедицина, 2011. № 3. С. 12-18. [Spasov A.A., Voronkova M.P., Singur G.L., Cheplyayeva N.I., Chepurnova M.V. Experimental model of diabetes mellitus type 2. *Biomeditsina = Biomedicine*, 2011, no. 3, pp. 12-18. (In Russ.)]
8. Шаронова Л.А., Вербовой А.Ф., Вербовая Н.И., Пашенцева А.В. Взаимосвязь неалкогольной жировой болезни печени и сахарного диабета 2-го типа // Русский медицинский журнал, 2017. № 22. С. 1635-1640. [Sharonova L.A., Verbovoy A.F., Verbovaya N.I., Pashentseva A.V. The relationship of non-alcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes mellitus. *Russkiy meditsinskiy zhurnal = Russian Medical Journal*, 2017, no. 22, pp. 1635-1640. (In Russ.)]

9. Bianchi E., Ripandelli G., Taurone S., Feher J., Plateroti R., Kovacs I., Magliulo G., Orlando M.P., Micera A., Battaglione E., Artico M. Age and diabetes related changes of the retinal capillaries: An ultrastructural and immunohistochemical study. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, 2016, Vol. 29, no. 1, pp. 40-53.
10. Celik S., Erdogan S., Tuzcu M., Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) exhibits significant potential as an antidiabetic and liver-protective agent in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Pharmacol. Res.*, 2009, Vol. 60, no. 4, pp. 270-276.
11. Cusi K., Sanyal A.J., Shuyu Zhang S., Hartman M.L., Bue-Valleskey J.M., Hoogwerf B.J., Haupt A. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) prevalence and its metabolic associations in patients with type 1 diabetes and type 2 diabetes. *J. Diabetes Obes. Metab.*, 2017, Vol 19, no. 11, pp. 1630-1634.
12. Haidara M.A., Dallak M., El Karib A.O., Abd Ellatif M., Eid R.A., Heidar E.H.A., Al-Ani B. Insulin protects against hepatocyte ultrastructural damage induced by type 1 diabetes mellitus in rats. *J. Ultrastruct. Pathol.*, 2018, Vol. 42, no. 6, pp. 508-515.
13. Kahraman N.K., Kahraman C., Koçak F.E., Coşgun S., Şanal B., Korkmaz M., Bayhan Z., Zeren S. Predictive value of neutrophil to lymphocyte ratio in the severity of non-alcoholic fatty liver disease among type 2 diabetes patients. *J. Acta Gastroenterol. Belg.*, 2016, Vol. 79, no. 3, pp. 295-300.
14. Koyama Y., Brenner D. Liver inflammation and fibrosis. *J. Clin. Invest.*, 2017, Vol. 127, no. 1, pp. 55-64.
15. Masarone M., Rosato V., Aglitti A., Bucci T., Caruso R., Salvatore T., Sasso F.C., Tripodi M.F., Persico M. Liver biopsy in type 2 diabetes mellitus: Steatohepatitis represents the sole feature of liver damage. *PLoS One*, 2017, Vol. 12, no. 6, e0178473. doi: 10.1371/journal.pone.0178473.
16. Mendes-Braz M., Martins J.O. Diabetes mellitus and liver surgery: the effect of diabetes on oxidative stress and inflammation. *Mediators Inflamm.*, 2018, Vol. 2018, pp. 1-11.
17. Robinson M.W., Harmon C., O'Farrelly C. Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis. *J. Cell. Mol. Immunol.*, 2016, Vol. 13, no. 3, pp. 267-276.
18. Rodríguez V., Plavnik L., Talamoni N.T. Naringin attenuates liver damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomed. Pharmacother.*, 2018, Vol. 105, pp. 95-102.
19. Romero-Zerbo S.Y., García-Fernández M., Espinosa-Jiménez V., Pozo-Morales M., Escamilla-Sánchez A., Sánchez-Salido L., Lara E., Cobo-Vuilleumier N., Rafacho A., Oliveira G., Rojo-Martínez G., Gauthier B.R., González-Mariscal I., Bermúdez-Silva F.J. The atypical cannabinoid abn-CBD reduces inflammation and protects liver, pancreas, and adipose tissue in a mouse model of prediabetes and non-alcoholic fatty liver disease. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, 2020, Vol. 11, no. 103, pp. 1-16
20. Sheweita S.A., Mashaly S. Newairy A.A., Abdou H.M., Eweda S.M. Changes in oxidative stress and antioxidant enzyme activities in streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats: role of alhagi maurorum extracts. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2016, Vol. 2016, 5264064. doi: 10.1155/2016/5264064.
21. Sanchez-Valle V., Chavez-Tapia N.C., Uribe M., Mendez-Sanchez N. Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: a review. *Curr. Med. Chem.*, 2012, Vol. 19, no. 28, pp. 4850-4860.
22. Shan Z., Cynthia J.C. Hepatic Macrophages in Liver Injury. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 17, no. 11, 322. doi: 10.3389/fimmu.2020.00322.
23. Sviklāne L., Olmane E., Dzērve Z., Kupčs K., Pirāgs V., Sokolovska J. Fatty liver index and hepatic steatosis index for prediction of non-alcoholic fatty liver disease in type 1 diabetes. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2018, Vol. 33, no. 1, pp. 270-276.
24. van Herck M.A., Weyler J., Kwanten W.J., Dirinck E.L., De Winter B.Y., Francque S.M., Vonghia L. The differential roles of T cells in non-alcoholic fatty liver disease and obesity. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 6, no. 10, 82. doi: 10.3389/fimmu.2019.00082.

Авторы:

Байкенова М.Б. — младший научный сотрудник ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук; аспирант ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

Соколова К.В. — младший научный сотрудник ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Baykenova M.B., Junior Research Associate, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Science; Postgraduate Student, B. Yeltsin Ural Federal University, Yekaterinburg, Russian Federation

Sokolova K.V., Junior Research Associate, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Science, Yekaterinburg, Russian Federation

Гетте И.Ф. – к.б.н., старший научный сотрудник
ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии»
Уральского отделения Российской академии наук,
г. Екатеринбург, Россия

Gette I.F., PhD (Biology), Senior Research Associate,
Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian
Academy of Science, Yekaterinburg, Russian Federation

Данилова И.Г. – д.б.н., доцент, заведующая
лабораторией морфологии и биохимии ФГБУН
«Институт иммунологии и физиологии» Уральского
отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург,
Россия

Danilova I.G., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Head,
Laboratory of Morphology and Biochemistry, Institute of
Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy
of Science, Yekaterinburg, Russian Federation

Поступила 31.05.2021
Принята к печати 07.11.2021

Received 31.05.2021
Accepted 07.11.2021