

## МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИНСУЛИН-СИНТЕЗИРУЮЩИХ КЛЕТОК РАЗЛИЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ В ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЕ ИНТАКТНЫХ КРЫС

© 2022 г. Т. С. Булавинцева<sup>1</sup> \*, Б. Г. Юшков<sup>1</sup>, И. Г. Данилова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН, Екатеринбург, 620049 Россия

\*E-mail: bulavincevat@gmail.com

Поступила в редакцию 12.08.2021 г.

После доработки 27.08.2021 г.

Принята к публикации 01.09.2021 г.

Исследование посвящено сравнению морфофункциональных особенностей, соотношения процессов апоптоза и пролиферации в популяциях инсулин-синтезирующих клеток (ИСК) поджелудочной железы различной локализации (панкреатические островки (ПО), одиночные ИСК и их агломераты) в физиологических условиях. На гистологических препаратах поджелудочной железы проводили количественную оценку распределения ИСК различной локализации, интенсивности иммуофлюоресцентного мечення инсулина, соотношения процессов пролиферации и апоптоза. Одиночные ИСК ацинарного эпителия в сравнении с ИСК другой локализации обладают наибольшим синтетическим потенциалом, на что указывают максимальные значения интенсивности флюоресценции инсулина и площади цитоплазмы. Ki-67<sup>+</sup>-ИСК присутствуют только в ПО, в то время как вне островковой части они не выявляются. Наибольшая доля TUNEL<sup>+</sup>-ИСК характерна для агломератов, среди одиночных ИСК TUNEL<sup>+</sup>-ИСК отсутствуют. Выявляется прямая взаимосвязь между интенсивностью флюоресценции инсулина  $\beta$ -клеток островков и количеством Ki-67<sup>+</sup>-ИСК в них. Островки с высокой интенсивностью флюоресценции инсулина содержат также наибольшее количество TUNEL<sup>+</sup>-ИСК по сравнению с другими ПО, что свидетельствует о значительном уровне их самообновления. В то же время ПО с низким содержанием инсулина характеризуются значительным преобладанием процесса апоптоза над пролиферацией. Таким образом, наши данные свидетельствуют, что строение и функциональная активность ИСК зависят от особенности их локализации, а их неоднородность создает основу для пластичности в условиях патологии.

**Ключевые слова:** инсулин, панкреатический островок, внеостровковые инсулин-синтезирующие клетки

**DOI:** 10.31857/S0041377122010035

Поджелудочная железа включает в себя две части – эндокринную, главным образом осуществляющую регуляцию углеводного обмена, и экзокринную, участвующую в пищеварении. Эндокринная часть представлена панкреатическими островками (ПО), окруженных ацинусами, что способствует их тесному морфофункциональному взаимодействию. ПО представляют собой “микроорганы” округлой формы, включающие в себя 5 типов эндокриноцитов, секретирующих свои гормоны (инсулин, глюкагон, соматостатин, панкреатический полипептид и грелин) в кровеносное русло и осуществляющих регуляцию углеводного обмена и пищеварения (Islam, 2008). Инсулин синтезирующие клетки (ИСК) в составе поджелудочной железы также находятся вне ПО в виде отдельно расположенных клеток или их агломератов. Агломераты представляют собой скоп-

ления от 2 до 5 ИСК, не включающие в свой состав другие гормон-синтезирующие клетки и не ограниченные капсулой из базальной мембраны, как ПО (Bouwens, Pipeleers, 1998), при этом они легче, чем последние переносят гипоксию (Merkwitz et al., 2013). Эти морфологические особенности позволяют рассматривать агломераты ИСК в качестве переходного этапа формирования ПО из функциональных предшественников эндокринных клеток (Merkwitz et al., 2013). Одиночные ИСК располагаются в составе ацинарного или протокового эпителия и имеют морфологические особенности, сходные с клетками ткани, в которой располагаются (Bouwens, Pipeleers, 1998; Bertelli et al., 2001; Можейко, 2007). Вне островковые ИСК принято считать одним из источников регенерации  $\beta$ -клеток ПО поджелудочной железы в условиях патологии (Merkwitz et al., 2013).

В совокупности островковые  $\beta$ -клетки и вне островковые ИСК (агломераты и одиночные клетки) могут рассматриваться в качестве единой инсулин-

**Принятые сокращения:** ИСК – инсулин-синтезирующая клетка; ПО – панкреатический островок; ЯЦО – ядерно-цитоплазматическое отношение.

синтезирующей системы, формирование которой начинается в период эмбрионального развития, завершается к двум месяцам после рождения и контролируется различными механизмами регуляции дифференцировки популяции клеток-предшественников в эндокринные клетки (Islam, 2008).

Достаточно много работ посвящено изучению клеточной архитектуры ПО. Однако до сих пор остаются не до конца изученными морфофункциональные особенности и соотношение процессов апоптоза и пролиферации ИСК различной локализации (ПО и вне островковые ИСК) в физиологических условиях. Исследование основ гетерогенности ИСК различной локализации в поджелудочной железе в физиологических условиях будут способствовать более полному пониманию реакции этих клеток в условиях патологии и разработке новых методов и подходов к лечению сахарного диабета.

Цель настоящей работы – сравнить морфофункциональные особенности, а также соотношение процессов апоптоза и пролиферации инсулин-синтезирующих клеток поджелудочной железы различной локализации (панкреатические островки, одиночные инсулин-синтезирующие клетки и их агломераты) в физиологических условиях.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Животные.** Исследование проведено на интактных крысах Вистар ( $n = 7$ ) обоего пола в возрасте 3 мес. в соответствии с принципами, сформулированными в Директиве 2010/63/ЕС. Исследования одобрены Этическим комитетом Института иммунологии и физиологии УрО РАН (протокол № 04/19 от 18.12.2019). Животных из эксперимента выводили с помощью внутримышечного введения зоветила в дозе 15 мг/кг (Virbac Sante Animale, Франция).

**Морфометрическое исследование.** Для гистологического исследования образцы поджелудочной железы фиксировали в 10%-ном забуференном формальдегиде, далее осуществляли стандартную подготовку образцов с последующей заливкой в парафин и подготовкой серийных срезов (толщиной 3 мкм).

Визуализацию изображения осуществляли на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе LSM 710 (CARL ZEISS, Германия), а морфометрический анализ с помощью программного обеспечения ZEN2010.

В ходе морфометрического исследования в 1 мм<sup>2</sup> паренхимы поджелудочной железы (N/мм<sup>2</sup>) подсчитывали общее количество ИСК, количество ИСК, локализованных в панкреатических островках, агломератах или в виде одиночных ИСК, в составе ацинарного эпителия или в перидуктальной области. Также определяли относительное количество пролиферирующих ИСК (Ki-67<sup>+</sup>-ИСК) и ИСК, вступивших в апоптоз (TUNEL<sup>+</sup>-ИСК), в процентах от общего количества ИСК различной локализации.

Пролиферацию ИСК различной локализации (ПО и внеостровковые) выявляли путем двойного иммунофлуоресцентного иммуномечения последовательным методом (Kumar, 2009). На первом этапе осуществляли демаскировку в цитратном буфере (рН 6.0) в течение 10 мин в микроволновой печи с последующим остыванием. Далее после отмывки демаскирующего буфера проводили этап иммуномечения маркера пролиферации с использованием первичных мышинных антител к Ki-67 крысы (BD, США) в разведении 1 : 150. Инкубацию с антителами проводили во влажной камере при 4°C в течение ночи, после отмывки осуществляли инкубацию в темноте (как и все последующие этапы окрашивания во избежание выгорания флуорофоров) со вторичными иммуноглобулинами козы против иммуноглобулинов мыши, конъюгированными с Texas Red (Abcam, США) в разведении 1 : 100 в течение 40 мин при 37°C во влажной камере. На третьем этапе после отмывки осуществляли иммуномечение инсулина с использованием мышинных первичных антител к инсулину крысы (clone E11D7; Millipore, Германия) в разведении 1 : 200. Препараты инкубировали с первичными антителами 1.5 ч во влажной камере, после отмывки инкубировали с иммуноглобулинами козы против иммуноглобулинов мыши, конъюгированными с Alexa Flore 488 (Abcam, США) в разведении 1 : 100 в течение 40 мин при 37°C во влажной камере. Ядра окрашивали NucRed Dead 647 (LifeTec, Germany) в течение 10 мин во влажной камере, защищенной от света.

Оценку апоптоза ИСК осуществляли путем выявления фрагментации ДНК методом TUNEL с использованием набора реагентов Thermo Fisher (США) с последующим иммунофлуоресцентным мечением инсулина, как было описано выше.

Негативный контроль окрашивания с помощью антител производили на аналогичных срезах поджелудочной железы по соответствующим протоколам, исключая первичные антитела (Kumar, 2009; Seeberger et al., 2014).

Во всех ИСК рассчитывали площадь цитоплазмы (мкм<sup>2</sup>) и ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО).

Содержание инсулина в ИСК различной локализации оценивали путем измерения интенсивности флуоресценции инсулин-позитивной области клеток (чем больше инсулина содержит клетка, тем больше антител с ней связывается и тем интенсивнее она флуоресцирует) (Carvalho et al., 2006). В зависимости от интенсивности флуоресценции инсулина все ПО были разделены на три типа: I тип – ПО с высоким содержанием инсулина (интенсивность флуоресценции инсулина от 41 усл. ед.); II тип – ПО со средним содержанием инсулина (интенсивность флуоресценции инсулина от 21 до 40 усл. ед.); III тип – ПО с низким содержанием инсулина (интенсивность флуоресценции до 20 усл. ед.).

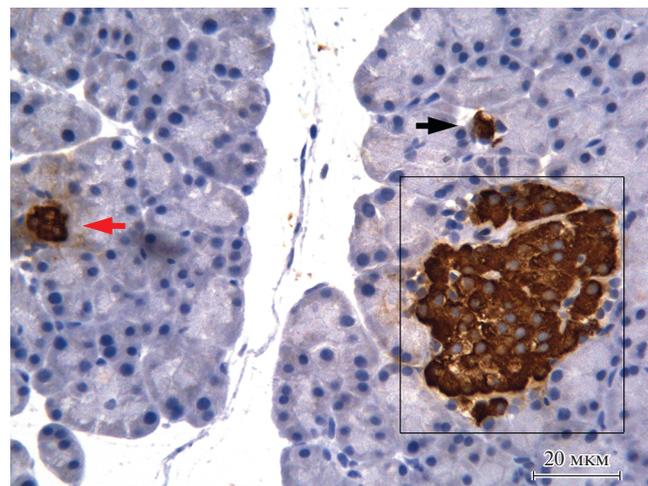
В ПО всех типов определяли диаметр их сечения (мкм), общую плотность клеток, количество  $\beta$ -клеток, Ki-67<sup>+</sup> $\beta$ -клеток и TUNEL<sup>+</sup> $\beta$ -клеток в расчете на 1 мм<sup>2</sup> эндокринной ткани (N/мм<sup>2</sup>) и в процентах от общего количества  $\beta$ -клеток островка.

**Статистический анализ.** Полученные данные анализировали с помощью программы STATISTICA 10. Вычисляли среднее арифметическое и ошибку среднего. Достоверность различий между группами оценивали по непараметрическому критерию Манна–Уитни (U), рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена. Различия считали значимыми при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Характеристика ИСК различной локализации.

Большая часть ИСК поджелудочной железы выявляется в составе ПО, а вне островков – около 2% в виде клеточных агломератов и одиночных клеток в составе ацинусов и протокового эпителия (рис. 1, табл. 1).  $\beta$ -клетки островков характеризуются округлой формой с центрально расположенным ядром. Одиночные ацино-инсулярные клетки имеют пирамидальную форму, ядро смещено ближе к базальной части клетки, цитоплазма равномерно окрашивается с помощью антител к инсулину. Одиночные ИСК перидуктальной области имеют округлую, вытянутую форму с эксцентрично расположенным ядром и равномерно окрашиваются с помощью антител к инсулину. ИСК агломератов обладают морфологическими признаками ацинарных и/или протоковых эпителиоцитов (рис. 1). Сравнительный морфометрический анализ ИСК различной локализации свидетельствует, что, несмотря на отсутствие различий в размерах их ядер, одиночные ИСК в составе ацинарного эпителия характеризуются наибольшими площадью цитоплазмы и интенсивностью флуоресцентного мечения инсулина по сравнению с оди-



**Рис. 1.** Инсулин-синтезирующие клетки с различной локализацией в паренхиме поджелудочной железы intactных животных. Рамкой выделен панкреатический островок, красной стрелкой – клеточный агломерат, черной стрелкой – одиночная клетка. Иммуногистохимическое выявление инсулина, ув. об. 40 $\times$ .

ночными ИСК перидуктальной области, ИСК агломератов и ПО. Эти данные свидетельствуют о высоком содержании инсулина в данном типе клеток (табл. 1).

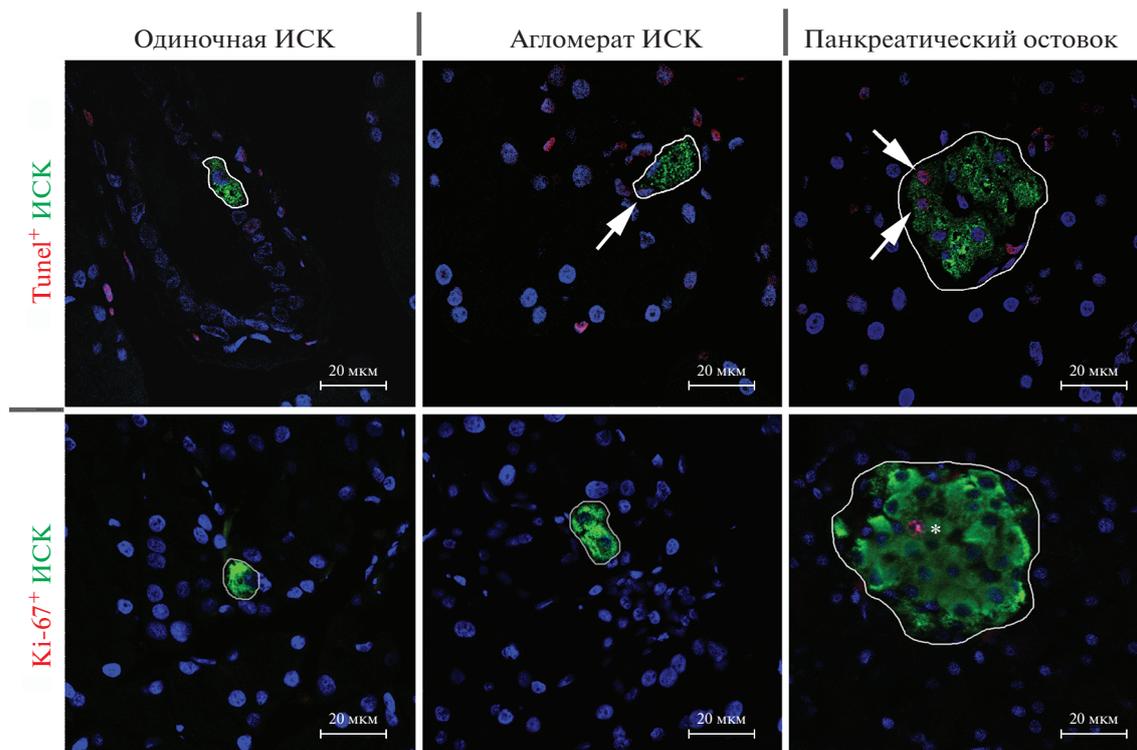
Доля ИСК, вступивших в апоптоз, в агломератах значительно превышает данный показатель в ПО. Среди одиночных ИСК TUNEL<sup>+</sup>-клетки не выявляются (рис. 2). Пролиферирующие ИСК локализуются в ПО, среди вне островковых ИСК Ki-67<sup>+</sup>-ИСК не обнаруживаются (табл. 1, рис. 2).

**Морфофункциональная характеристика панкреатических островков.** Несмотря на то, что ПО характеризуются сходными показателями общего количе-

**Таблица 1.** Характеристика ИСК с различной локализацией в паренхиме поджелудочной железы

Показатель	Панкреатический островок	Агломераты	Одиночные ИСК	
			Ацинусы	Перидуктальная область
Количество ИСК в 1 мм <sup>2</sup> паренхимы	107.1 $\pm$ 10.5	1.6 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	0.42 $\pm$ 0.06 <sup>a, b</sup>	0.21 $\pm$ 0.04 <sup>a, b, c</sup>
Доля ИСК от общего количества ИСК, %	97.8 $\pm$ 0.3	0.6 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	0.37 $\pm$ 0.07 <sup>a, b</sup>	0.18 $\pm$ 0.04 <sup>a, b, c</sup>
Интенсивность флуоресценции инсулина ИСК, усл. ед.	33.7 $\pm$ 1.7	32.8 $\pm$ 4.4	43.3 $\pm$ 4.0 <sup>a, b</sup>	28.9 $\pm$ 1.8 <sup>c</sup>
S цитоплазмы, мкм <sup>2</sup>	48.6 $\pm$ 3.4	50.1 $\pm$ 5.4	87.8 $\pm$ 8.0 <sup>a, b</sup>	63.7 $\pm$ 6.1 <sup>c</sup>
S ядра, мкм <sup>2</sup>	24.5 $\pm$ 0.6	25.6 $\pm$ 1.0	23.4 $\pm$ 1.1	21.7 $\pm$ 2.2
ЯЦО ИСК	0.35 $\pm$ 0.01	0.36 $\pm$ 0.03	0.23 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.30 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>
Доля TUNEL <sup>+</sup> -ИСК от общего количества ИСК, %	1.9 $\pm$ 0.4	22.5 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>	Не опред.	Не опред.
Доля Ki-67 <sup>+</sup> -ИСК от общего количества ИСК, %	0.49 $\pm$ 0.05	Не опред.	Не опред.	Не опред.

S – площадь; ИСК – инсулин-синтезирующая клетка. Приводятся средние значения по группам и их стандартные ошибки. Отличия достоверны для  $P \leq 0.05$  от группы: <sup>a</sup> – панкреатический островок; <sup>b</sup> – агломерат ИСК; <sup>c</sup> – одиночные ИСК ацинусов.



**Рис. 2.** Инсулин-синтезирующие клетки с различной локализацией в паренхиме поджелудочной железы intactных животных. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: верхняя панель – выявление фрагментации ДНК (TUNEL) и инсулина, *стрелками* указаны двойные позитивные клетки; нижняя панель – иммунофлуоресцентное выявление маркера пролиферации Ki-67 и инсулина. \* – пролиферирующая ИСК панкреатического островка.

ства клеток, содержания β-клеток, а также размеров ядра и цитоплазмы β-клеток, ПО обладают значительной гетерогенностью (табл. 2). Основное количество ПО представлено островками с высокой (I тип) и средней (II тип) интенсивностью флюоресценции иммуномеченого инсулина в β-клетках ( $37 \pm 3$  и  $45 \pm 3\%$  соответственно), доля ПО с низкой интенсивностью флюоресценции инсулина (III тип) составляет  $18 \pm 3\%$  от общего количества. В результате сравнительного анализа ПО с различной интенсивностью иммуномечения инсулина выявлено:

ПО I типа (островки с высоким уровнем флюоресценции инсулина) характеризуются минимальными размерами, наибольшим количеством пролиферирующих β-клеток (Ki-67<sup>+</sup>-ИСК) и высоким уровнем апоптоза β-клеток;

ПО II типа (островки со средним уровнем флюоресценции инсулина) обладают средним количеством пролиферирующих β-клеток (Ki-67<sup>+</sup>-ИСК) и наименьшим уровнем апоптоза β-клеток;

ПО III типа (островки с низким уровнем флюоресценции инсулина) занимают наименьшую долю от общего количества островков, при этом в них выявляется наименьшее количество пролиферирующих β-клеток (Ki-67<sup>+</sup>-ИСК). Анализ соотношения апоптоза и пролиферации демонстрирует значи-

тельное преобладание уровня апоптоза над пролиферацией (табл. 2).

Корреляционный анализ свидетельствует, что количество Ki-67<sup>+</sup>-ИСК коррелирует (коэффициент корреляции 0.927) с интенсивностью флюоресценции инсулина в ПО, т.е. чем выше содержание инсулина в островках, тем больше пролиферативная активность их β-клеток. Анализ корреляции между интенсивностью флюоресценции инсулина и уровнем апоптоза выявил наличие слабой связи между этими параметрами (коэффициент корреляции 0.500).

## ОБСУЖДЕНИЕ

В физиологических условиях ИСК поджелудочной железы располагаются в составе ПО, агломератов и в виде одиночных клеток, расположенных в ацинусах и протоковом эпителии.

Результаты проведенного нами исследования свидетельствуют, что ИСК ПО характеризуются выраженной морфофункциональной неоднородностью. Можно выделить три основных типа ПО по интенсивности флюоресценции иммуномеченого инсулина в их β-клетках, при этом показана прямая взаимосвязь между данным показателем и пролиферативной активностью β-клеток. Вместе с этим, островки с высоким содержанием инсулина характери-

**Таблица 2.** Сравнительная характеристика панкреатических островков с различной синтетической активностью

Показатель	I тип (от 41 усл. ед.)	II тип (21–40 усл. ед.)	III тип (до 20 усл. ед.)
Доля от общего количества ПО, %	37 ± 3	45 ± 3	18 ± 3 <sup>a, b</sup>
Характеристика островка			
Диаметр ПО, мкм	54 ± 4	73 ± 6 <sup>a</sup>	73 ± 7 <sup>a</sup>
Общее количество клеток ПО в 1 мм <sup>2</sup> ПО	11313 ± 677	11064 ± 407	10912 ± 828
Количество β-клеток в 1 мм <sup>2</sup> ПО	7098 ± 226	7000 ± 233	7947 ± 405
Доля β-клеток, % от общего количества клеток	60 ± 4	59 ± 2	66 ± 2
Количество Ki-67 <sup>+</sup> β-клеток в 1 мм <sup>2</sup> ПО	42.6 ± 4.1	28.2 ± 3.4 <sup>a</sup>	14.9 ± 3.3 <sup>a, b</sup>
Доля Ki-67 <sup>+</sup> β-клеток, % от всех β-клеток	0.8 ± 0.1	0.5 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.3 ± 0.01 <sup>a, c</sup>
Количество TUNEL <sup>+</sup> β-клеток/мм <sup>2</sup> ПО	234 ± 56	108 ± 18 <sup>a</sup>	172 ± 39
Доля TUNEL <sup>+</sup> β-клеток, % от всех β-клеток	3.4 ± 1.0	1.6 ± 0.3 <sup>a</sup>	2.2 ± 0.7
TUNEL <sup>+</sup> β-клеток/Ki-67 <sup>+</sup> β-клеток	5.3 ± 0.8	4.3 ± 0.3	14.8 ± 3.4 <sup>a, b</sup>
Характеристика β-клеток островка			
S ядра β-клеток, мкм <sup>2</sup>	22.6 ± 1.2	24.9 ± 0.6	24.4 ± 0.9
S цитоплазмы β-клеток, мкм <sup>2</sup>	44.31 ± 4,25	43.67 ± 3.70	41.13 ± 2.62
ЯЦО β-клеток	0.34 ± 0.01	0.37 ± 0.02	0.36 ± 0.02

S – площадь; ПО – панкреатический островок; ИСК – инсулин-синтезирующая клетка. Приводятся средние значения по группам и их стандартные ошибки. Отличия достоверны при  $P \leq 0.05$  от группы: <sup>a</sup> – панкреатический островок; <sup>b</sup> – агломерат ИСК; <sup>c</sup> – одиночные ИСК ацинусов.

зуются не только наибольшей митотической активностью β-клеток, но также и высоким уровнем апоптоза ИСК по сравнению с другими ПО, что свидетельствует о значительном уровне их самообновления. Можно предположить, что такие ПО являются недавно образованными (наиболее онтогенетически “молодыми”). Эта гипотеза согласуется с результатами других исследований (Peng et al., 2009), свидетельствующими, что у мышей образование ПО продолжается и после рождения, замедляется по мере взросления и останавливается к двухмесячному возрасту, при этом митотическая активность β-клеток островка коррелирует с длиной теломеров в ИСК (Peng et al., 2009). С другой стороны, крупные ПО с низким содержанием инсулина и значительным сдвигом соотношения пролиферации и апоптоза в сторону преобладания последнего можно рассматривать в качестве островков, образованных в наиболее ранние сроки онтогенеза. Это согласуется с данными об увеличении размеров ПО у старых крыс, снижении в них уровня пролиферации β-клеток (Kehm et al., 2018) и интенсификации процессов апоптоза (Shuang et al., 2013).

Согласно результатам морфометрического анализа ИСК различной локализации, клетки ацинарного эпителия в сравнении с ИСК другой локализации обладают наибольшим синтетическим потенциалом, а именно большим количеством инсулина и

объемом цитоплазмы. Морфофункциональная неоднородность ИСК, вероятно, является результатом морфогенеза органа. Большая часть ИСК (около 80%) образуется на эмбриональном этапе в результате дифференцировки клеток-предшественников, локализованных в протоковом эпителии, и конверсии ациноцитов в эндокринные клетки (Islam, 2008; Gittes, 2009).

Также существует мнение, что агломераты ИСК представляют собой структуру незаконченного эмбрионального этапа формирования островков из клеток-предшественников (Merkwitz et al., 2013). С одной стороны, это подтверждается общностью морфофункциональных характеристик ИСК агломератов и β-клеток островка. С другой стороны, следуя данной гипотезе, ожидается наличие в агломератах пролиферирующих ИСК. Однако в нашем исследовании не удалось выявить митотически активные ИСК в агломератах, напротив, здесь отмечается высокая доля ИСК, вступивших в апоптоз. Поскольку литературные данные свидетельствуют, что у мышей формирование ПО заканчивается в течение двух месяцев после рождения (Peng et al., 2009), а наши исследования выполнены на 3-х месячных животных, когда необходимая масса ИСК уже набрана и дальнейшее ее наращивание не требуется, отсутствие пролиферации ИСК и высокий уровень апоптоза в

агломератах можно рассматривать как фактор, ограничивающий новообразование островков.

Одиночные ИСК располагаются в составе ацинарного или протокового эпителия. Содержание инсулина в ацино-инсулярных клетках соответствует уровню ПО с высокой синтетической активностью. Вместе с этим данные клетки содержат два типа секреторных гранул (зимогена и инсулина), основная их масса контактирует с перикапиллярным пространством и только немногие имеют связь с выводными протоками (Яглов, Яглова, 2010). Имеются данные, свидетельствующие о локализации большей части митотически делящихся ациноцитов вблизи ПО, кроме того, эти клетки характеризуются повышенной функциональной активностью (Можейко, 2007), что обусловлено паракринным действием инсулина, который облегчает поступление глюкозы и аминокислот в клетку (Qaid, 2016). ПО обычно окружает базальная мембрана, отделяя его от экзокринной паренхимы (Можейко, 2007), в то время как вне островковой зоны клетки способны секретировать инсулин непосредственно в межклеточное пространство и образовывать межклеточные контакты с клетками ациносов, тем самым осуществляя паракринную регуляцию экзокринной функции поджелудочной железы (Bertelli et al., 2001). В то же время достаточно много исследований посвящено изучению ациноцитов в качестве пула клеток, способного к трансформации в инсулин-секретирующие клетки в условиях патологии (Baeyens et al., 2009). При этом одиночные ИСК протокового эпителия представляются в качестве начальной стадии дифференцировки клеток-предшественников инсулоцитов (Scharfmann et al., 2008; Desgraz et al., 2011), поскольку существует много свидетельств повышения их числа при ожирении и во время беременности (Bouwens, Pipeleers, 1998).

Таким образом, в физиологических условиях популяция ИСК поджелудочной железы характеризуется выраженной гетерогенностью морфологии и функциональной активности, которая зависит от особенностей их локализации. Эта неоднородность создает основу для пластичности в условиях патологии. Можно предположить, что ИСК поджелудочной железы разной локализации представляют единую систему. Однако механизмы взаимодействия между отдельными инсулин-синтезирующими клетками требуют дальнейших исследований.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственной темы ИИФ УрО РАН.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены при проведении исследования. Все эксперименты на животных были одобрены Эти-

ческим комитетом Института иммунологии и физиологии УрО РАН (№ 04/19 от 18.12.2019) и выполнены в соответствии с принципами, сформулированными в Директиве 2010/63/ЕС.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Можейко Л.А. 2007. Эндокринно-экзокринные взаимоотношения поджелудочной железы: история вопроса. Журн. ГрГМУ. № 3. С. 7. (Mozheyko L.A. 2007. Interrelation between the exocrine and endocrine parts of the pancreas: history of the problem. J. GrGMU. № 3. P. 7.)
- Яглов В.В., Яглова Н.В. 2010. Актуальные проблемы биологии ациноостровковых клеток поджелудочной железы. Вестник российской АМН. № 7. С. 28 (Yaglov V.V., Yaglova N.V. 2010. Actual problems of biology of acino-islet cells of the pancreas. Vestnik rossiiskoi AMN. № 7. P. 28.)
- Baeyens L., Bonne S., Bos T., Rooman I., Peleman C., Lahlouette T., German M., Heimberg H., Bouwens L. 2009. Notch signaling as gate-keeper of rat acinar-to-beta-cell conversion in vitro. Gastroenterology. V. 136. P. 1750. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.01.047>
- Bertelli E., Regoli M., Orazioli D., Bendayan M. 2001. Association between islets of Langerhans and pancreatic ductal system in adult rat. Where endocrine and exocrine meet together? Diabetologia. V. 44. P. 575. <https://doi.org/10.1007/s001250051663>
- Bouwens L., Pipeleers D.G. 1998. Extra-insular beta cells associated with ductules are frequent in adult human pancreas. Diabetologia. V. 41. P. 629.
- de Carvalho P.F.C., Martins J.C.R., da Cunha D.A., Boschero A.C., Collares-Buzato C.B. 2006. Histomorphology and ultrastructure of pancreatic islet tissue during in vivo maturation of rat pancreas. Anat. Anz. V. 188. P. 221.
- Desgraz R., Bonal C., Herrera P.L. 2011. b-Cell regeneration: the pancreatic intrinsic faculty. Trends Endocrinol. Metab. V. 22. P. 34.
- Gittes G.K. 2009. Developmental biology of the pancreas: a comprehensive review. Dev. Biol. V. 326. P. 4. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.10.024>
- Islam S. 2009. Islet of Langerhans. Springer. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.10.024>
- Kehm R., König J., Nowotny K., Jung T., Deubel S., Gohlke S., Schulz T.J., Höhn A. 2018. Age-related oxidative changes in pancreatic islets are predominantly located in the vascular system. Redox Biol. V. 15. P. 387.
- Kumar G.L., Rudbeck L. 2009. Education guide. Immunohistochemical (IHC) staining methods. California: Dako North.
- Merkwitz C., Blaschuk O.W., Schulz A., Lochhead P., Meister J., Ehrlich A., Ricken A.M. 2013. The ductal origin of structural and functional heterogeneity between pancreatic islets. Prog. Histochem. Cytochem. V. 48. P. 103.
- Peng S.-W., Zhu L.-Y., Chen M., Zhang M., Li D.-Z., Fu Y.-C., Chen S.-R., Wei C.-J. 2009. Heterogeneity in mitotic activity and telomere length implies an important role of young

- islets in the maintenance of islet mass in the adult pancreas. *Endocrinology*. V. 150. P. 3058.  
<https://doi.org/10.1210/en.2008-1731>
- Qaid M.M., Abdelrahman M.* 2016. Role of insulin and other related hormones in energy metabolism. *Cogent Food and Agriculture*. V. 2. 1267691.  
<https://doi.org/10.1080/23311932.2016.1267691>
- Scharfmann R., Xiao X., Heimberg H., Mallet J., Ravassard P.* 2008. Beta cells within single human islets originate from multiple progenitors. *PLoS ONE*. V. 3. P. 3559.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003559>
- Seeberger K.L., Anderson S.J., Ellis C.E., Yeung T.Y., Korbutt G.S.* 2014. Identification and differentiation of PDX1  $\beta$ -cell progenitors within the human pancreatic epithelium. *World J. Diabetes* V. 5. P. 59.
- Shuang W., Qian-qian S., Bing X., Xiu-Jun L.* 2013. Pancreatic islet cell autophagy during aging in rats. *Clin. Invest. Med.* V. 36. P. 72.  
<https://doi.org/10.25011/cim.v36i2.19569>

## Morphofunctional Characteristics of Insulin-Synthesizing Cells of Different Localization in the Pancreas of Intact Rats

T. S. Bulavintseva<sup>a, \*</sup>, B. G. Yushkov<sup>a</sup>, and I. G. Danilova<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, 620049 Russia*

*\*e-mail: bulavincevat@gmail.com*

The study is devoted to the comparison of morphofunctional features, the ratio of the processes of apoptosis and proliferation of insulin-synthesizing cells (ISC) population of the pancreas of different localization (pancreatic islets (PIs), single ISC and their agglomerates) in physiological conditions. On histological preparations of the pancreas, the quantitative analyses of ISCs of different localization, the intensity of insulin fluorescence, the ratio of the processes of their proliferation and apoptosis were determined. Single ISCs of the acinar epithelium, in comparison with ISCs of other localization, have the highest synthetic potential, expressed in the maximum values of the intensity of insulin fluorescence and the area of the cytoplasm. The study of the ratio of the processes of proliferation (Ki-67) of the ISC indicates that Ki-67<sup>+</sup> ISCs are present only in the PIs, while they are not detected outside the PIs. The largest ratio of TUNEL<sup>+</sup> ISCs from the total number of ISCs is determined in agglomerates and is absent in single ISCs. A direct relationship was revealed between the intensity of insulin fluorescence of  $\beta$ -cells of the islets and the amount of Ki-67 + ISCs in them. Islets with a high intensity of insulin fluorescence also have the highest amount of TUNEL + ISCs in comparison with other PIs, which indicates a significant level of their self-renewal. At the same time, PIs with a low insulin content are characterized by a significant predominance of apoptosis over proliferation. Our data indicate that the structure and functional activity of ISCs depend on the peculiarities of their localization, and their heterogeneity creates the basis for plasticity in pathological conditions.

*Keywords:* insulin, pancreatic islet, extraisletal insulin-synthesizing cells