



О.О. Коновалова, О.М. Камишний

## РЕМОДЕЛЮВАННЯ ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТИ

Запорізький державний медичний університет

**Ключові слова:** жирова тканина, цукровий діабет, адипоцити.

В експерименті показано вплив експериментального стрептозотоцинового цукрового діабету на цитоархітектоніку парапанкреатичної жирової тканини у щурів лінії Вістар. Встановлено, що розвиток діабету супроводжується зниженням загальної кількості білих жирових клітин у парапанкреатичній клітковині на 34% ( $p < 0,05$ ) стосовно контролю, не впливає на їхню відсоткову частину в структурі популяції, а також призводить до збільшення площі великих адипоцитів на 13% ( $p < 0,05$ ) на тлі стабільності інших досліджених морфометричних параметрів жирових клітин.

### Ремоделирование жировой ткани при экспериментальном сахарном диабете

О.А. Коновалова, А.М. Камышный

В эксперименте показано влияние экспериментального стрептозотоцинового сахарного диабета на цитоархитектонику парапанкреатической жировой ткани у крыс линии Вистар. Установлено, что развитие диабета сопровождается снижением общего количества белых жировых клеток в парапанкреатической клетчатке на 34% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем, не влияет на их процентную долю в структуре популяции, а также приводит к увеличению площади больших адипоцитов на 13% ( $p < 0,05$ ) при стабильности остальных изученных морфометрических параметров жировых клеток.

**Ключевые слова:** жировая ткань, сахарный диабет, адипоциты.

### Remodeling of the adipose tissue in experimental diabetes mellitus model

О.А. Konovalova, А.М. Kamyshnyi

Influence of experimental streptozotocin diabetes mellitus on cytoarchitectonic parapancreatic fat tissue in male Wistar rats has been studied in our experiment. It has been established that development of diabetes is accompanied by the decline of general amount of white fat cells in a parapancreatic layer in 34% ( $p < 0,05$ ) compared to control group, it does not influence on their percent proportion in the structure of population, and also results in the increase of area of large adipocytes in 13% ( $p < 0,05$ ) at stability of other studied morphometric parameters of adipocytes.

**Key words:** fat tissue, diabetes mellitus, adipocyte.

Цукровий діабет 1 типу (ЦД 1 типу) є хронічним аутоімунним захворюванням із прогресуючою селективною деструкцією  $\beta$ -клітин панкреатичних острівців і розвитком абсолютної інсулінової недостатності, підтвердженням чому є виявлення у хворих на ЦД 1 типу і на різних моделях експериментального діабету (миші лінії NOD, C57B1, BB-щури, стрептозотоциновий діабет) інфільтрації панкреатичних острівців (інсуліт) клітинами адаптивного і вродженого імунітету: цитотоксичними  $CD8^+$ -лімфоцитами і NK-клітинами, Т-хелперами 1 і 17 типів, макрофагами і нейтрофілами, виявлення аутоантитіл до панкреатичних антигенів [1]. Картина патогенезу ЦД 1 типу, істотно доповнена за останні роки, свідчить про активну участь імунних механізмів у порушенні ендокринної функції панкреатичних острівців [1]. Останнім часом з'являється все більше даних щодо ролі жирової тканини в організмі як одного з регуляторів активності функціонування імунної системи [2,3]. Отже, жирова тканина є не тільки важливим метаболічним регулятором та ендокринним органом, що синтезує більш ніж 30 регуляторних білків – «адипокінів», але й важливим органом імунної системи [4,5], дизрегуляція якого призводить до морфологічної перебудови – «ремоделювання» адипоцитів, розвиток запалення жирової тканини є невід'ємним компонентом прогресування багатьох захворювань [6,7]. Якщо роль жирової тканини в розвитку таких «ауто запальних» захворювань, як атеросклероз, ЦД 2 типу, метаболічний

синдром детально досліджено, про що свідчать результати багатьох експериментальних робіт, то дані про значення морфофункціонального стану цієї тканини в розвитку ЦД 1 типу практично відсутні.

#### МЕТА РОБОТИ

З'ясування морфо-функціонального стану адипоцитів парапанкреатичної клітковини у щурів лінії Вістар з експериментальним цукровим діабетом (ЕЦД).

#### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження виконано на 20 статевозрілих самцях-щурах лінії Вістар вагою 115–135 г. Тварин отримано з розплідника об'єднання ветеринарної медицини ПП «Біомодельсервіс» (Київ). Експериментальну частину роботи виконували відповідно до національних «Загальних етичних принципів досліджень на тваринах» (Україна, 2001) і положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують для експериментальних і інших наукових цілей» (Страсбург, 1985).

Тварин розподілено на дві експериментальні групи по 10 щурів: контрольні щури, яким одноразово внутрішньоочеревинно вводили 0,5 мл 0,1 М цитратного буферу (рН = 4,5) (група 1); щури з 7-денним експериментальним стрептозотоциновим діабетом (група 2). Стрептозотин (STZ) (SIGMA Chemical, США), розчинений в 0,5 мл 0,1 М цитратному буфері (рН 4,5) перед моментом введення, вводили щурам внутрішньоочеревинно в дозі 50 мг/кг. Час,

що минув з дня введення препарату, надалі інтерпретували як тривалість перебігу діабету.

Визначення концентрації глюкози в крові, яку брали з хвостової вени, проводили глюкозооксидазним методом із застосуванням приладу «BIONIMERightest™GM 110» (Швейцарія) через 12 годин і на 1, 2, 3, 5, 7 добу після ін'єкції стрептозоточину. Вимірювання рівня глікемії здійснювали через 6 годин після останнього прийому їжі. На 3 добу після введення стрептозоточину для подальших досліджень відбирали тварин із рівнем глікемії натще >8,0 ммоль/л. На 7 добу після введення STZ тварин виводили з експерименту декапітуванням під наркозом. Вилучали ділянки парапанкреатичної клітковини (ППК), які на 20 годин занурювали в фіксатор Буена і після промивки заливали в парапласт. Структуру популяції адипоцитів ППК вивчали на основі аналізу серійних гістологічних зрізів і даних їх морфометричних і денситометричних характеристик.

Для дослідження на ротаційному мікроскопі MICROM HR-360 (Microm, Німеччина) робили 5-мікронні серійні зрізи ППК, які потім депарафінували в ксилолі, здійснювали регідратацію в низхідних концентраціях етанолу (100%, 96%, 70%), відмивали в 0,1 М фосфатному буфері (pH = 7,4) і фарбували гематоксиліном-еозинном. Зображення, отримане на мікроскопі PrimoStar (ZEISS, Німеччина) за допомогою високочутливої камери AxioCam 5c (ZEISS, Німеччина) і пакета програм для отримання, архівування та підготовки зображень до публікації AxioVision 4.7.2 (ZEISS, Німеччина), вводили в персональний комп'ютер.

Ідентифікацію адипоцитів в отриманому зображенні проводили в ручному режимі за допомогою комп'ютерної програми ImageJ (НИН, США). Основними морфометричними характеристиками клітин були: їхня площа (AREA), периметр (PERIM), максимальний (Major) і мінімальний (Minor) еліптичні діаметри. Додаткові морфометричні характеристики клітин – циркулярність (Circularity) та округлість (Roundness). Циркулярність обчислювали за формулою  $Circularity = 4\pi \cdot AREA / PERIM^2$ . Її значення дорівнювало 1 для ідеально круглих об'єктів і наближалось до 0 для максимально витягнутих. Округлість обчислювали як відношення площі до максимального діаметра:  $Roundness = 4 \cdot Area / \pi \cdot (Majoraxis)^2$ . Денситометричними характеристиками клітин була їх інтегрована оптична щільність (Integrated density) =  $\lg(D_i/D_0)$  (одиниць оптичної щільності  $UO_{opt}$ ), де  $D_i$  і  $D_0$  – показники оптичної щільності клітини і міжклітинної речовини («фону» препарату) відповідно. На основі класифікаційного математичного аналізу серед адипоцитів визначали великі, середні і малі, що відрізняються площею, периметром і циркулярністю.

Всі отримані експериментальні дані оброблено на персональному комп'ютері за допомогою додатку для роботи з електронними таблицями EXCEL з пакета MS Office 2010 (Microsoft Corp., США), STATISTICA 6.0 (Stat-Soft, 2001). Для всіх показників розраховували значення середньої арифметичної вибірки (M), її дисперсії і помилки середньої (m). Для виявлення достовірності різниць результатів досліджень у дослідних і контрольних групах тварин визначали

коефіцієнт Стьюдента (t), після чого визначали можливість різниці вибірок (p) і довірчий інтервал середньої. Критичний рівень значущості при перевірці статистичних гіпотез вважали таким, що дорівнює 0,05.

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Введення експериментальним тваринам STZ призводило до розвитку ЕЦД: так, до 7 дня розвитку патологічного процесу концентрація глюкози в крові у щурів лінії Вістар збільшувалась у 3,5 рази ( $9,97 \pm 0,34$  ммоль/л,  $p < 0,05$ ) порівняно з контролем ( $2,84 \pm 0,11$  ммоль/л). Спостерігали полідипсію, гіперфагію і поліурію, тобто всі основні симптоми, характерні для ЦД 1 типу. Парапанкреатична клітковина безпосередньо оточує підшлункову залозу, крім того, в ній розташовані панкреатичні лімфатичні вузли, що є основним місцем, де відбувається активація «наївних» лімфоцитів панкреатичними антигенами. Тому зміни її клітинного складу можуть мати суттєвий вплив на прогресування діабету. Вивчення щільності популяції (ЩП) адипоцитів виявило, що у парапанкреатичній клітковині у контрольних щурів цей показник становить  $100 \pm 11$  клітин на  $3 \text{ мм}^2$ . У структурі популяції переважаючим типом жирових клітин виявились великі адипоцити, процентна частка яких склала  $37,0 \pm 5,3\%$ , дещо менше визначено малих та середніх адипоцитів (табл. 1). Розвиток діабету супроводжувався зниженням сумарної кількості адипоцитів на  $34\%$  ( $p < 0,05$ ) щодо до контролю за рахунок зменшення кількості жирових клітин усіх класів. Так, ЩП великих адипоцитів знижувалась на  $32\%$  ( $p < 0,05$ ), ЩП середніх адипоцитів – на  $30\%$  ( $p < 0,05$ ), малих адипоцитів – на  $36\%$  ( $p < 0,05$ ) (табл. 1). При цьому в структурі популяції адипоцитів при розвитку цукрового діабету достовірних змін стосовно контролю не визначено.

Таблиця 1

#### Кількість адипоцитів у парапанкреатичній клітковині у щурів лінії Вістар (M±m)

Серії	Великі адипоцити	Середні адипоцити	Малі адипоцити	Сумарна щільність адипоцитів
Контроль	$37 \pm 5$ $37,0 \pm 5,3\%$	$30 \pm 4$ $29,6 \pm 3,6\%$	$33 \pm 5$ $33,3 \pm 4,6\%$	$100 \pm 11$
Діабет 1 тиждень	$25 \pm 2^1$ $37,2 \pm 3,6\%$	$21 \pm 3^1$ $31,2 \pm 4,1\%$	$21 \pm 3^1$ $31,6 \pm 5,1\%$	$66 \pm 6^1$

Примітка: у чисельнику – щільність популяції адипоцитів (на  $3 \text{ мм}^2$ ), у знаменнику – процентна частка окремих класів адипоцитів; <sup>1</sup> – достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  стосовно контролю.

Вивчення морфометричних параметрів жирових клітин у парапанкреатичній клітковині у контрольних щурів виявило: великі адипоцити характеризуються найбільшою величиною площі, що втричі більша, ніж у середніх адипоцитах, й у 8 разів більша, ніж у малих адипоцитах (табл. 2). Периметр цих клітин відповідно на  $39\%$  та втричі більший (табл. 2). Циркулярність, що приймає значення від «1» для ідеально округлих клітин до «0» для клітин із максимально вираженою границею клітинної мембрани з глибокими інвагінаціями, найбільша – у малих, найменша – у середніх



адипоцитах. Вимірювання показника оптичної щільності, що характеризує тинкторіальні властивості клітин, виявило: великі адипоцити є найбільш пофарбованими клітинами, а для інших досліджуваних типів клітин величина цього показника зменшується зі зменшенням їх розмірів і досягає найменшого значення у малих адипоцитів (табл. 2).

Таблиця 2

### Морфометричні характеристики адипоцитів (M±m)

Класи адипоцитів	Площа, мкм <sup>2</sup>	Периметр, мкм	Циркулярність	Оптична щільність (УО <sub>ощ</sub> )
Великі адипоцити	1374±46 <sup>1</sup> 1550±66 <sup>1</sup>	159±3 164±4	0,674±0,008 0,696±0,010	0,258±0,009 0,272±0,012
Середні адипоцити	468±8 477±9	97±1 96±1	0,639±0,010 0,659±0,010	0,082±0,002 0,078±0,002
Малі адипоцити	180±5 179±5	57±1 57±1	0,687±0,009 0,704±0,011	0,029±0,001 0,027±0,001

*Примітка:* у чисельнику – морфометричні показники адипоцитів контрольних щурів, у знаменнику – діабетичних; <sup>1</sup> – достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  стосовно контролю.

Слід зазначити, розвиток цукрового діабету супроводжувався збільшенням площі великих адипоцитів на 13% ( $p < 0,05$ ) щодо контролю при стабільності інших вивчених морфометричних параметрів (табл. 2).

Відомо, що жирова тканина може містити кластери клітин вродженої та адаптивної імунної системи, такі як макрофаги, дендритні клітини, NK- і NKT-лімфоцити, цитотоксичні лімфоцити, Т-регуляторні Treg, різні субпопуляції Т-хелперів (Th1, Th2, Th17), що інфільтрують адипоцити [3,5,8]. Від балансу цих клітин залежить рівень прозапальної сигналізації до жирової тканини та продукція таких цитокінів, як IL1 $\beta$ , IL6, IL17, IL18, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , здатних безпосередньо впливати на прогресію інсуліну [9,10]. Зокрема, самі адипоцити експресують майже весь спектр відомих Toll-подібних рецепторів (Toll-like receptors, TLRs), а їх лігандами можуть бути не тільки патоген-асоційовані молекулярні патерни, але й власні метаболіти, зокрема насичені жирні кислоти [2,5,11,12]. Так, у жировій тканині гризунів визначено toll-подібні рецептори від TLR-1 до TLR-9, а Корр А. et al. (2009) в адипоцитах людини виявили експресію TLR-1, -2, -4, -5, -7, -8, -10 [5]. При цьому TLR-5, -7 і -10 більше експресуються на клітинах мікрооточення, ніж на адипоцитах.

Найдетальніше досліджено TLR-2 та TLR-4, при цьому останній вид рецептора наявний у жировій тканині в суттєво більшій кількості, ніж інші TLRs [2,5]. Активація TLRs в адипоцитах призводить до синтезу різних цитокінів і хемокінів, що підтримують запальний процес. Характерно, що імунні клітини жирової тканини відіграють роль регулятора їх продукції.

Отже, активація макрофагів, що інфільтрують адипоцити, може відбуватись класичним і альтернативним шляхами [10,13]. Для класичної активації макрофагів (M1) необхідні IFN $\gamma$  та TNF $\alpha$ , причому надалі такі M1-макрофаги продукують IL12 і викликають диференціювання наївних Т-хелперів

у напрямі прозапальних Th1-клітин [13]. Крім того, такі макрофаги відрізняються збільшеною продукцією активних форм кисню та азоту, прозапальних цитокінів IL1 $\beta$ , IL6, IL8, IL12, IL18, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , збільшеною експресією МНСII та індукцією синтезу окисню азоту iNOS, будучи одним із тригерів розвитку запалення жирової тканини [10]. В свою чергу, основними індукторами альтернативної активації макрофагів (M2) є IL4 або IL13. Такі макрофаги характеризуються підвищеною експресією коstimуляторних молекул CD80 і CD86, рецепторів манози CD206, фагоцитарного гемоглобінового рецептора CD163, зниженою чутливістю до LPS, слабкою здатністю продукувати прозапальні цитокіни та активувати Nf- $\kappa$ B [13]. M2-макрофаги спрямовують диференціювання Т-клітин у напрямі Th2 та є супресорами імунної відповіді в жировій тканині за рахунок продукції характерних для Т-регуляторних клітин цитокінів IL10 і IL13 (для них запропоновано термін «регуляторні макрофаги»), запобігаючи розвитку запалення в цьому регіоні [13].

Зауважимо, біла жирова тканина може виступати в ролі джерела клітин для диференціювання природжених лімфоцитів (Innatelymphoidcells, ILCs), що характеризуються низьким рівнем реаранжування генів Т-клітинного рецептора, відсутністю МНС-рестрикції, інтенсивною експресією патерн-розпізнавальних рецепторів і здатністю розпізнавати, перш за все, мікробні і непептидні антигени [14]. Так, Roglio S. et al. (2012) продемонстрували, що ізольовані з жирової тканини мишей стовбурові клітини фенотипово подібні до гематопоетичних стовбурових клітин кістково-мозкового походження і здатні *in vitro* диференціюватись у мієлоїдному або лімфоїдному напрямі [14]. Koenen T. et al. (2011) засвідчили, що вісцеральна жирова тканина (ВЖТ) має більш виражений прозапальний потенціал у порівнянні з підшкірною (ПЖТ) [15]. Зокрема, відсоток CD8+Т-лімфоцитів у ВЖТ був значно вищий, ніж у ПЖТ (41,6 проти 30,4%,  $p < 0,05$ ). Адипоцити ВЖТ характеризувались більшою продукцією IL-1 $\beta$  (у 10 разів,  $p < 0,05$ ), IL-18 (у 3 рази,  $p < 0,05$ ), IL-6 і IL-8 (у 3 і 4 рази відповідно,  $p < 0,05$ ) у порівнянні з ПЖТ [15]. І, нарешті, активність каспази-1 в адипоцитах ВЖТ була втричі більше, що створює умови для активації інфламасоми та пояснює більшу «схильність» ВЖТ до розвитку запалення [15].

Отримані результати збігаються з даними Ghorbani A. et al. (2010), які продемонстрували, що розвиток STZ-індукованого діабету у щурів призводить до ремоделювання жирової тканини, а це виявляється в зменшенні маси ВЖТ і збільшенні діаметра адипоцитів [16]. У свою чергу, контроль рівня глікемії у хворих на СД 1 типу призводить до зміни співвідношення ВЖТ до ПЖТ [17]. Так, якщо без лікування це співвідношення складало 0,29±0,15 ( $p < 0,05$ ), то нормалізація рівня глюкози призводила до зміни цього індексу до 0,36±0,18 ( $p < 0,05$ ) [17].

### ВИСНОВКИ

1. Розвиток діабету супроводжується зниженням загальної кількості білих жирових клітин у паранепанкреатичній клітковині на 34% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з контролем за рахунок



зменшення щільності популяції великих адипоцитів на 32% ( $p < 0,05$ ), середніх адипоцитів на 30% ( $p < 0,05$ ) і малих адипоцитів 36% ( $p < 0,05$ ), і при цьому не впливає на їхню процентну частку в структурі популяції.

2. Розвиток діабету призводить до збільшення площі великих адипоцитів на 13% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з контролем при стабільності інших вивчених морфометричних параметрів жирових клітин.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Culina S.* Insulin and type 1 diabetes: immune connections / *Culina S., Brezar V., Mallone R.* // *Eur. J. Endocrinol.* – 2013. – Vol. 17. – P. 19–31.
2. *Schäffler A.* Adipose tissue as an immunological organ: toll-like receptors, C1q/TNFs and CTRPs / *Schäffler A., Schölmerich J., Salzberger B.* // *Trends Immunol.* – 2007. – Vol. 28. – P. 393–399.
3. *Schäffler A.* Innate immunity and adipose tissue biology / *Schäffler A., Schölmerich J.* // *Trends Immunol.* – 2010. – Vol. 31 (6). – P. 228–235.
4. *Kaminski D.* Adaptive immunity and adipose tissue biology / *Kaminski D., Randall T.* // *Trends Immunol.* – 2010. – Vol. 31 (10). – P. 384–390.
5. *Kopp A.* Innate immunity and adipocyte function: ligand-specific activation of multiple Toll-like receptors modulates cytokine, adipokine, and chemokine secretion in adipocytes / *Kopp A., Buechler C., Neumeier M.* // *Obesity.* – 2009. – Vol. 17 (4). – P. 648–656.
6. *Matarese G.* At the crossroad of T cells, adipose tissue, and diabetes / *Matarese G., Procaccini C., De Rosa V.* // *Immunol Rev.* – 2012. – Vol. 249 (1). – P. 116–134.
7. *Procaccini C.* Obesity and susceptibility to autoimmune diseases / *Procaccini C., Carbone F.* // *Expert Rev Clin Immunol.* – 2011. – Vol. 7 (3). – P. 287–294.
8. *Feuerer M.* Fat Treg cells: a liaison between the immune and metabolic systems / *Feuerer M., Herrero L., Cipolletta D.* // *Nat Med.* – 2009. – Vol. 15 (8). – P. 930–939.
9. *Caspar-Bauguil S.* Adipose tissue lymphocytes: types and roles / *Caspar-Bauguil S., Cousin B., Bour S.* // *J Physiol Biochem.* – 2009. – Vol. 65 (4). – P. 423–436.
10. *Jung S.* The role of adipose tissue-associated macrophages and T lymphocytes in the pathogenesis of inflammatory bowel disease / *Jung S., Saxena A., Kaur K.* // *Cytokine.* – 2013. – Vol. 61 (2). – P. 459–468.
11. *Schipper H.* Adipose tissue-resident immune cells: key players in immunometabolism / *Schipper H., Prakken B., Kalkhoven E., Boes M.* // *Trends Endocrinol Metab.* – 2012. – Vol. 23 (8). – P. 407–415.
12. *Lolmède K.* Immune cells in adipose tissue: key players in metabolic disorders / *Lolmède K., Duffaut C., Zakaroff-Girard A.* // *Diabetes Metab.* – 2011. – Vol. 37 (4). – P. 283–290.
13. *Espinoza-Jiménez A.* Alternatively activated macrophages in types 1 and 2 diabetes / *Espinoza-Jiménez A., Peón A., Terrazas L.* // *Mediators Inflamm.* – 2012. – Vol. 35. – P. 81–89.
14. *Poglio S.* In situ production of innate immune cells in murine white adipose tissue / *Poglio S., De Toni F., Lewandowski D.* // *Blood.* – 2012. – Vol. 13, №120 (25). – P. 4952–4962.
15. *Koenen T.* The inflammasome and caspase-1 activation: a new mechanism underlying increased inflammatory activity in human visceral adipose tissue / *Koenen T., Stienstra R., van Tits L.* // *Endocrinology.* – 2011. – Vol. 152 (10). – P. 3769–3778.
16. *Ghorbani A.* Type-1 diabetes induces depot-specific alterations in adipocyte diameter and mass of adipose tissues in the rat / *Ghorbani A., Varedi M., Hadjzadeh M., Omrani G.* // *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* – 2010. – Vol. 118 (7). – P. 442–448.
17. *Jacob A.* The visceral and subcutaneous fat changes in type 1 diabetes: a pilot study / *Jacob A., Adams-Huet B., Raskin P.* // *Diabetes Obes Metab.* – 2006. – Vol. 8 (5). – P. 524–530.

#### Відомості про авторів:

Камишний О.М., д. мед. н., доцент, зав. каф. мікробіології, вірусології та імунології ЗДМУ.

Коновалова О.О., магістр із лабораторної діагностики, ст. лаборант каф. мікробіології, вірусології та імунології ЗДМУ.

Поступила в редакцію 16.04.2013 г.