

О. Осирко, студ., Ю. Дудкина, студ., И. Николаева, асп., Т. Галенова, канд. биол. наук
 Киевский национальный университет имени Тараса Шевченка, Киев, Украина,
 О. Марущак, асп.
 Институт зоологии имени И. И. Шмальгаузена НАН Украины, Киев, Украина

РАЗНООБРАЗИЕ И СВОЙСТВА ЗАЩИТНЫХ ПЕПТИДОВ ИЗ КОЖНЫХ СЕКРЕТОВ БЕСХВОСТЫХ АМФИБИЙ

Катионные противомикробные белки являются важной частью врожденного неспецифического иммунитета, первого защитного барьера, присущего почти всем живым организмам. Основной задачей таких белков является уничтожение опасных микроорганизмов (грибков, бактерий, вирусов, паразитов и т. д.). Кожа амфибий является богатым источником соединений, содержащих такие молекулы, которые производятся и депонируются в расположенных на дорзальной стороне тела кожных железах. В настоящее время защитные белки были обнаружены у всех семейств земноводных, что указывает на возможность использования связи между структурой этих белков, частей генома, ответственных за их производство в эволюционных исследованиях, и поиске филогенетических связей между отдельными группами амфибий. Более того, антимикробные белки могут использоваться в современной медицине. Амфибии могут стать богатым источником биологически активных веществ, использование которых может дать новый виток фармацевтической промышленности. У этих веществ было открыто гораздо больше возможностей, чем считалось ранее. Например, они могут использоваться в качестве коагулянтов или как компоненты противовирусной терапии. Таким образом, изучение свойств антимикробных белков в Украине (из 15 видов бесхвостых земноводных, относящихся к 5 семействам – Pelobatidae, Hylidae, Bufonidae, Ranidae и Bombinatoridae) является очень перспективным и многообещающим направлением совместных исследований в областях биохимии и зоологии. В этой статье описываются химические особенности и свойства противомикробных белков, известных в настоящее время из литературы, и их присутствия в разных семействах бесхвостых земноводных. Основная цель работы – показать изменчивость этих веществ у амфибий, чтобы создать основу для дальнейших исследований антимикробных белков в Украине и изучения их фармацевтического потенциала.

Ключевые слова: антимикробные пептиды; амфибии; защитные пептиды; кожные железы; секреты.

УДК 616-056.52

Н. Белемеч, асп., Т. Фалалеева, д-р биол. наук,
 Т. Берегова, д-р биол. наук, Л. Остапченко, д-р биол. наук
 ННЦ "Институт биологии та медицини",
 Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
 Н. Кобиляк, канд. мед. наук, О. Курик, д-р мед. наук
 Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, Київ, Україна,
 О. Суласва, д-р мед. наук
 Патоморфологічна лабораторія "CSD Health Care", Київ, Україна

МОРФОГЕНЕЗ ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ ЗА УМОВ ГЛУТАМАТ-ІНДУКОВАНОГО ОЖИРІННЯ: МЕХАНІЗМИ КОРИГУЮЧОЇ ДІЇ МЕЛАНІНУ

Досліджено морфогенез підшлункової залози в щурів за умов глутамат-індукованого ожиріння та оцінювання ефектів меланіну за певних умов. Дослідження здійснено на 45 новонароджених самцях щурів Wistar, розділених на 3 групи по 15 тварин у кожній. 1 група – новонародженим щурам інтактної групи підшкірно в кількості 8 мкл/г вводили фізіологічний розчин на 2–10-й день життя. 2 група – новонародженим щурам підшкірно в кількості 8 мкл/г вводили глутамат натрію (ГН) (4 мг/г) відповідно на 2–10-й день життя. 3 група щурів отримувала меланін (1 мг/кг), розчинений у воді (0,25 мл/100 г) (внутрішньошлунково, в/ш). Група II відповідно отримувала 2,5 мл/кг води (в/ш). Меланін було отримано з дріжджоподібних штамів *Pseudonadsoniellabrunnea* (*Nadsoniellanigra* X1 з Української антарктичної станції). Введення меланіну починали через 4 тижні після народження та продовжували двотижневими курсами з перервами у 2 тижні. Протягом 4 місяців після народження щури перебували на звичайному харчовому раціоні. 4-місячних тварин декапітували, забирали підшлункову залозу для гістологічного та імуногістохімічного дослідження. Підшлункову залозу фіксували в 10 % формаліні, зневоднювали і заливали парафіновим воском. Парафінові ділянки 5 мкм були розрізані та забарвлені гематоксиліном та еозином. Оскільки запалення є одним із провідних механізмів ураження підшлункової залози під час ожиріння, прозапальну активацію клітин підшлункової залози аналізували імуногістохімічною оцінкою клітин CD68, експресією NF-κB та TNF-α.

Введення глутамату натрію викликало розвиток ожиріння зі збільшенням обсягу вісцерального жиру, зростанням кількості в ньому прозапальних макрофагів та підвищенням експресії NF-κB і TNFα. У підшлунковій залозі відбувалася гіперплазія інсулярного апарату, асоційована з макрофагальною інфільтрацією і підвищенням експресії COX-2. Введення меланіну запобігало порушенню морфогенезу підшлункової залози у тварин з глутамат-індукованим ожирінням, нівелюючи активацію прозапальних сигнальних шляхів.

Ключові слова: глутамат натрію, ожиріння, клітини CD68, експресія NF-κB і TNF-α, меланін.

Вступ. За висновком Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), ожиріння є однією з найбільш актуальних проблем у зв'язку з його високою поширеністю по всьому світу, а також його внеском у високі показники супутньої захворюваності та смертності [9]. Метаболічні порушення під час ожиріння призводять до виникнення ряду захворювань, а саме до розвитку цукрового діабету 2 типу, кардіоваскулярної патології (артеріальна гіпертензія, атеросклероз, ішемічна хвороба серця, цереброваскулярні розлади), змінопорно-рухового апарату (остеохондроз хребта та обмінно-дистрофічний поліартрит), уражень гепато-біліарної системи (дискінезія жовчного міхура, хронічний холецистит, жовчнокам'яна хвороба, неалкогольне жирове

ураження печінки), злоскісних новоутворень, зокрема раку легень, молочної залози, раку тіла матки і яєчника тощо. [6, 25]. Ожиріння зменшує тривалість життя на 3–5, а інколи, у разі тяжких форм, на 15 років [29].

Ожиріння, особливо в ранньому онтогенезі, – це багатофакторний процес, який супроводжується змінами харчової поведінки, системних механізмів регуляції метаболізму [3, 25]. Це неминуче позначається не тільки на функціонуванні, а й на морфогенезі підшлункової залози (ПЗ). ПЗ має дві частини: екзокринну, що продукує широкий спектр травних ферментів, і ендокринну, яка формує 1–3 % маси залози і є джерелом панкреатичних гормонів [22, 27]. Ендокринна і екзокринна частини ПЗ розвиваються з одного ембрі-

онального джерела [3, 10] і тісно пов'язані анатомічно, однак при цьому часто ці дві частини вивчаються окремо один від одного [2, 5, 14, 17, 27].

Результати досліджень, присвячених оцінюванню стану екзокринної частини ПЗ у разі ожиріння та цукрового діабету 2 типу (ЦД2), суперечливі. Деякі автори продемонстрували зниження маси ацинусів ПЗ [14, 19]. Інші, навпаки, довели збільшення об'єму ПЗ як за рахунок панкреатичного жиру, так і за рахунок маси ацинусів [13, 21]. Однією з потенційних причин порушень функціонування екзокринної частини ПЗ під час ожиріння вважається запалення [8, 19]. Ця концепція підтверджується фактором частоти асоціації ожиріння з розвитком панкреатиту [9, 16, 26].

З іншого боку, відомо, що ожиріння як фактор ризику розвитку діабету 2 типу пов'язане з гіперінсулінемією [24]. Останній, по суті, є компенсаторним механізмом, спрямованим на підтримку нормоглікемії. Основним джерелом продукції інсуліну є бета-клітини островців ПЗ [20, 22]. Завдяки пластичності і феномену трансдиференціювання можливе збільшення кількості бета-клітин і маси ендокринних островців [1, 2]. Крім того, у разі ожиріння описано збільшення питомої площі островців на 30 % і підвищення маси бета-клітин на 50 % [18, 28]. З іншого боку, надлишкове навантаження на бета-клітини може призводити до їх пошкодження та зниження кількості [14, 30]. Зважаючи на багатфакторність етіологічних чинників, залишається незрозумілим, що первинне – ураження ендо- чи екзокринної частини ПЗ у разі ожиріння? Які механізми та морфогенетичні прояви дисфункції ПЗ у разі ожиріння в ранній постнатальний період? Це, у свою чергу, обмежує можливості корекції дисфункції ПЗ під час ожиріння.

Раніше нами було показано протективні ефекти меланіну, що знижує розвиток глутамат-індукованої ожиріння в ранній постнатальний період і обмежує розвиток неалкогольного жирового пошкодження печінки [4].

Метою цієї роботи було вивчення морфогенезу ПЗ у разі глутамат-індукованого ожиріння та оцінюванню ефектів меланіну за певних умов.

Матеріали й методи. Дослідження виконано на 45 щурах-самцях з дотриманням нормативів Конвенції з біоетики Ради Європи 1997 року, Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей, загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 року), інших міжнародних угод та національного законодавства у цій галузі. Тварин утримували в умовах акредитованого віварію згідно зі "Стандартними правилами по упорядкуванню, устаткуванню та утриманню експериментальних біологічних клінік (віваріїв)". Прилади, що використовувалися для наукових досліджень, підлягали метрологічному контролю.

Щурів було розділено на 3 групи по 15 тварин в кожній. Новонародженим щурам I групи підшкірно в

кількості 8 мкл/г вводили 0,9 % NaCl. Новонародженим щурам II та III груп підшкірно в кількості 8 мкл/г вводили глутамат натрію (4 мг/г) відповідно на 2, 4, 6, 8, 10-й день життя [11, 12]. Протягом 4 місяців після народження щури перебували на звичайному харчовому раціоні. III група отримувала меланін (1 мг/кг), розчинений у воді (0,25 мл/100 г) (внутрішньошлунково, в/ш). Група II відповідно отримувала 2,5 мл/кг води (в/ш). Введення починали через 4 тижні після народження та продовжували двотижневими курсами з перервами у 2 тижні. Протягом 4 місяців у щурів усіх груп було зроблено аналіз змін маси тіла. 4-місячних тварин декапітували, збирали ПЗ для гістологічного та імуногістохімічного дослідження [5, 18].

ПЗ фіксували в 10 % нейтральному формаліні протягом 1-2 діб. Далі препарат піддавали зневодненню у розчині ацетилового спирту зростаючих концентрацій (70 %, 80 %, 90 %, 96 % – по одній добі в кожному розчині), просвітленню у діоксані (0,5–2 год.) та хлороформі (1 год.), просочуванню сумішшю парафіну з хлороформом 1:1 (до 2 год. при температурі + 37 °C) та чистим парафіном (2 год. при температурі + 56 °C), після чого заливали у чистий розплавлений парафін. Парафінові зрізи підшлункової залози завтовшки до 5 мкм виготовляли на санному мікротомі, фарбували гематоксиліном з дофарбуванням еозинном.

Для оцінки наявності та вираженості запальних змін на тлі експериментального ожиріння було здійснено імуногістохімічне дослідження з оцінкою кількості і розподілу CD68 позитивних клітин [7]. Крім того, оцінювали експресію таких відомих маркерів запалення, як NF- κ B і циклооксигеназа 2 (COX2), а також експресію TNF-альфа імуногістохімічно за стандартним протоколом [5, 15]. Підраховували відсоток імунопозитивних клітин в різних компартментах ПЗ. Інтенсивність імунопозитивних клітин оцінювали напівкількісним методом як слабку (1+), помірну (2+) або виражену (3+) [18, 23].

Під час оцінювання ендокринної частини ПЗ виконували вимірювання діаметра островців і оцінку кількості клітин у межах одного островця.

Статистична обробка даних здійснювалася у пакеті програм "Statistica 8.0". Для аналізу виду розподілу даних було використано Вкритерій Шапіро–Уїлка. Оскільки дані виявилися нормально розподіленими, то для статистичної обробки було використано критерій Лева на для оцінки рівності дисперсій і *t*-критерій Ст'юдента – для незалежних вибірок. Розраховували середнє значення (*M*) і стандарт квадратичне відхилення (*SD*). Значущими вважали відмінності при *p* ≤ 0,05.

Результати та обговорення. Розвиток глутамат-індукованого ожиріння супроводжувався накопиченням вісцерального жиру, в межах якого визначалися гіпертрофовані адипоцити, з ділянками запальної інфільтрації. Проведення імуногістохімічного дослідження виявило наявність між адипоцитами і в межах інфільтратів значної кількості прозапальних макрофагів, що експресували NF- κ B і TNF α (рис. 1).

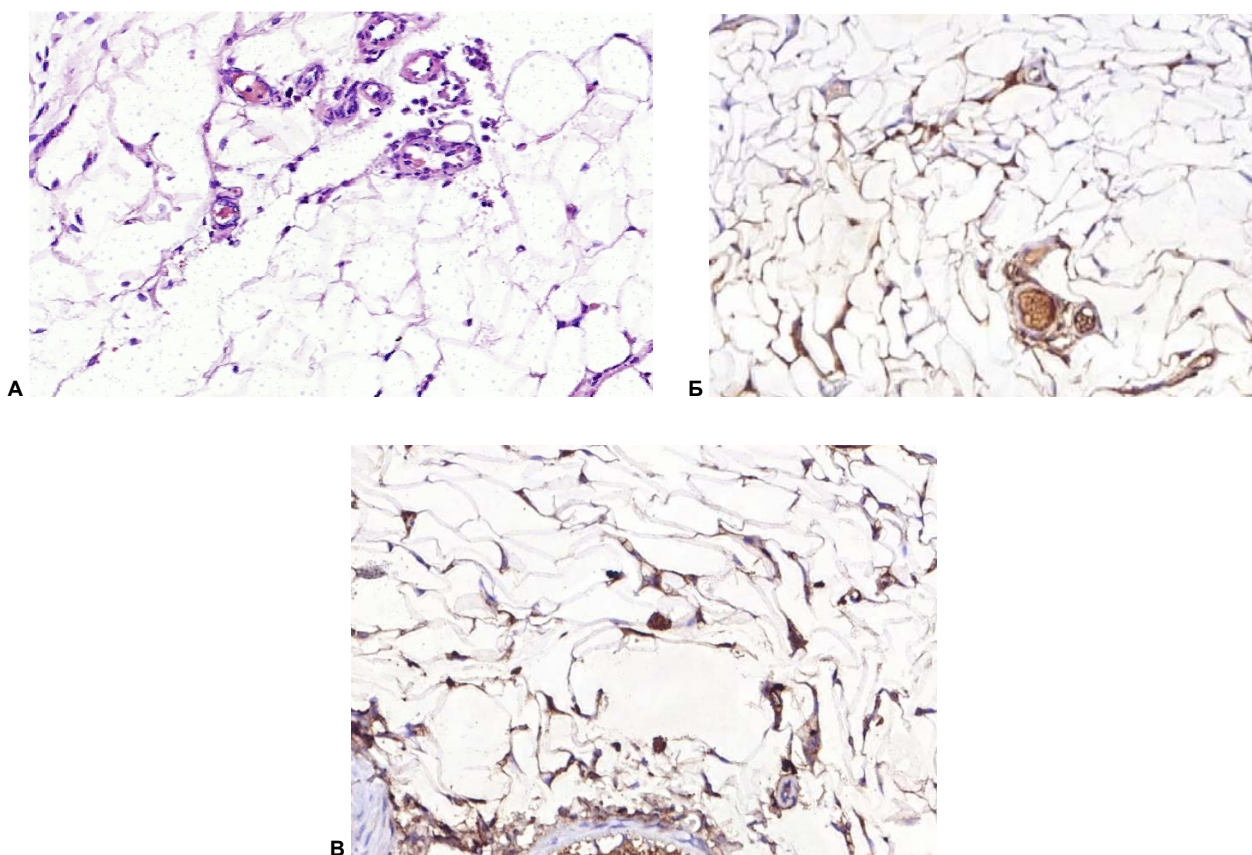


Рис. 1. Жирова тканина за експериментального глутамат-індукованого ожиріння.

А – запальні зміни на тлі гіпертрофії адипоцитів. Забарвлення гематоксилином і еозином. 36. 100.

Б – експресія NF-kB і B' – експресія TNFα. Імуногістохімічне дослідження з використанням МАТ до NF-kB і TNFα. 36. 100

Вивчення морфології ПЗ у тварин з глутамат-індукованим ожирінням виявило зміну пропорцій екзо- і ендокринної частин залози. Ці зміни були обумовлені

збільшенням кількості, розміру і щільності розташування острівців Лангерганса. Вони розташовувалися групами, формуючи пари або каскади (рис. 2).

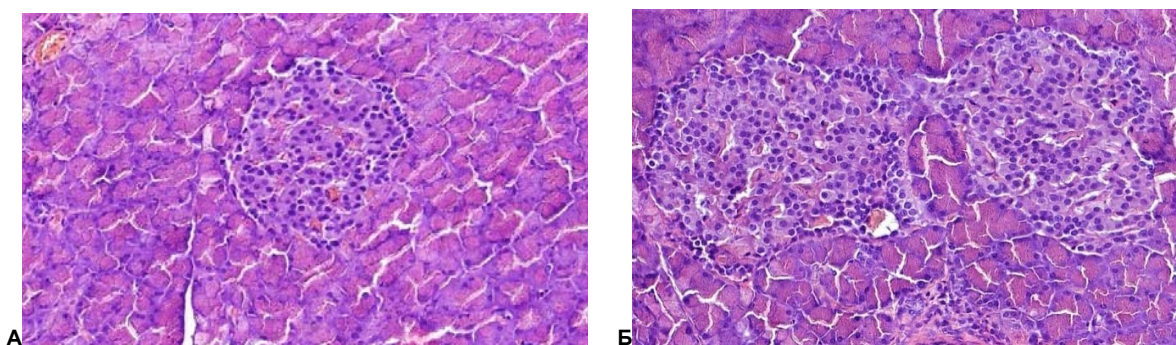


Рис. 2. Збільшення кількості та розмірів ендокринних острівців підшлункової залози за умов глутамат-індукованого ожиріння. Забарвлення гематоксилином і еозином. 36. 200

Частина острівців мали витягнуту форму, і були розташовані переважно на периферії часточок – іноді близько до міжчасточкових перегородок і протоків. Середній діаметр острівців у тварин експериментальної групи зріс більш, ніж в 2 рази ($P < 0,001$). Це супроводжувалося збільшенням кількості і щільності ендокринних клітин в межах острівця, що дозволяє говорити про гіперплазію інсулоцитів. Середня кількість ендокринних клітин в острівці в межах одного зрізу зросла з 122 ± 8 до 204 ± 15 ($P < 0,001$). При цьому найбільша щільність розташування ендокринних клітин була зареєстрована на периферії острівців. Зміна щільності клітин і розмірів острівців супрово-

джувався незначним збільшення кількості і щільності кровоносних судин з ознака активної перфузії.

Екзокринна частина ПЗ у тварин з глутамат-індукованим ожирінням характеризувалася варіабельними проявами зміни секреторної активності ацинусів – у них варіювала вираженість зимогенної зони. Хоча при цьому не виявлено достовірних змін розмірів ацинусів. У деяких випадках у міжчасточкових перегородках було помічено скупчення адипоцитів великих розмірів.

Характерно ознакою для тварин з глутамат-індукованим ожирінням була наявність у міжчасточкових перегородках лейкоцитарної інфільтрації – переважно в периваскулярних і перидуктальних зонах (рис. 3).

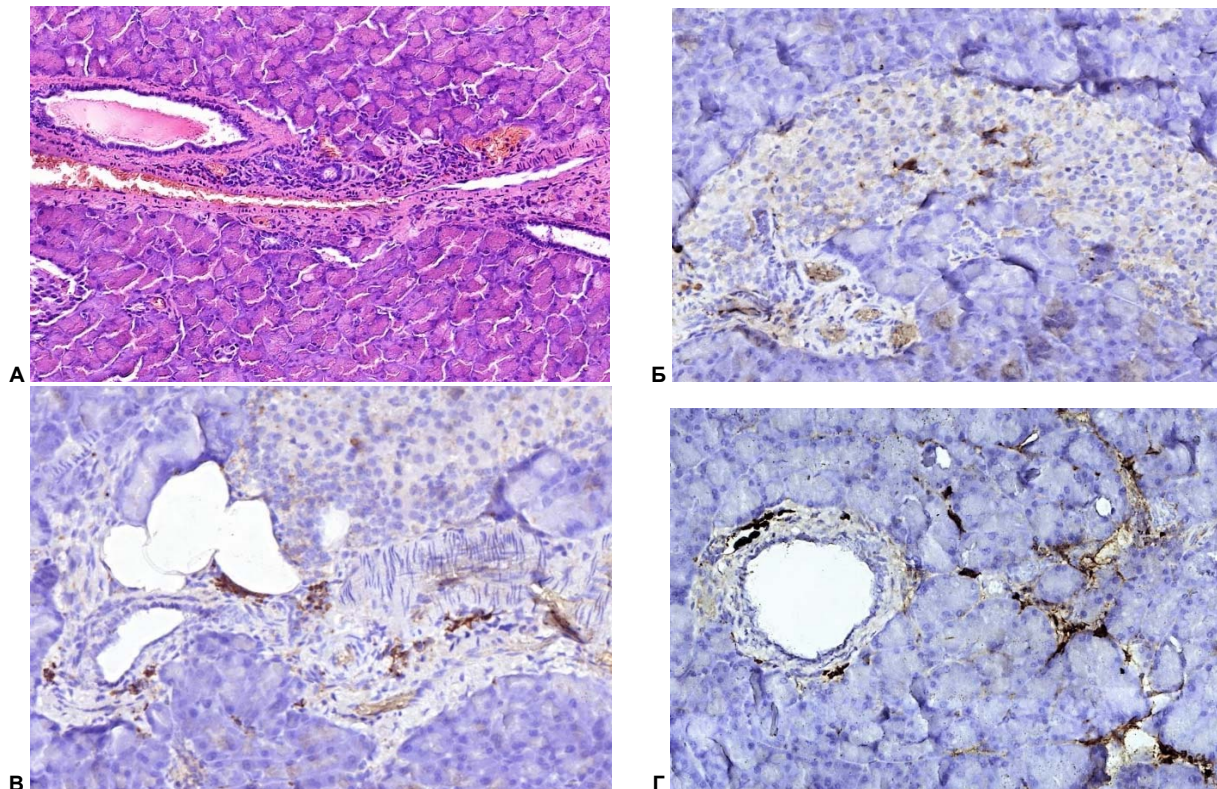


Рис. 3. Запальні зміни в підшлунковій залозі, асоційовані зі збільшенням кількості макрофагів за глутамат-індукованого ожиріння.

А – Лейкоцитарна інфільтрація міжчасточкових перегородок. Забарвлення гематоксиліном і еозиним.

Б–Г – макрофаги в межах острівців (Б), міжчасточкових перегородок (В) і навколо ацинусів (Г).
Імуногістохімічне дослідження до CD68. 36. 100

Виразність інфільтрації варіювала від слабкої до помірної. Проведення імуногістохімічного дослідження виявило значне збільшення кількості макрофагів в екзокринній частині ПЗ – в межах міжчасточкових перегородок і всередині часточок – в періацинарному просторі ($P < 0,001$). Крім того, макрофаги визначалися в межах ендокринних острівців ($2,8 \pm 0,3$ CD68-позитивних клі-

тин в межах одного острівця), хоча в контрольних тварин CD68-позитивних клітин не було виявлено в острівцях. Наявність CD68+ макрофагів у експериментальних тварин була асоційована з підвищенням експресії COX-2 і NF-kB. Експресія COX-2 виявлена у вигляді мозаїчної позитивної реакції в клітинах острівців (рис. 4).

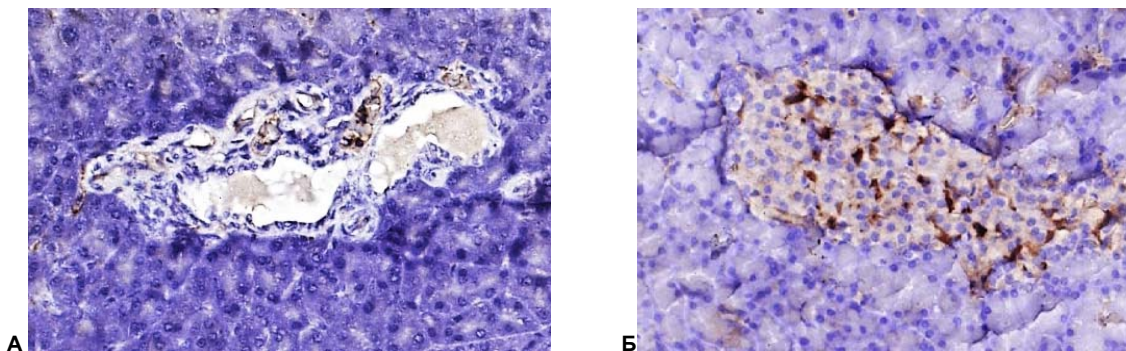


Рис. 4. Експресія COX-2 у міжчасточкових перегородках (А) й острівцях (Б) підшлункової залози за глутамат-індукованого ожиріння. Імуногістохімічне дослідження з використанням МАТ до COX2

В екзокринній частині також було помічено виражену позитивну реакцію на COX-2 і NF-kB, яка виявлена в периваскулярній зоні та в ділянках інфільтрації.

Таким чином, глутамат-індуковане ожиріння супроводжувалося розвитком гіперплазії інсулярного апарату ПЗ і запальними змінами в екзокринній частині залози. Останнє було обумовлено збільшенням кількості макрофагів з активацією експресії COX-2 і NF-kB.

Введення меланіну запобігало патологічним змінам в ПЗ. У межах екзокринної частини ПЗ виявлялися лише поодинокі макрофаги, ознаки значущої лейкоцитарної інфільтрації були відсутні. Ендокринні острівці мали розміри порівняно з такими в контрольній групі. Кількість ендокринних клітин в межах одного острівця була статистично значуще нижча за показник у тварин з глутамат-індукованим ожирінням ($P < 0,001$) і не відрізнялася від такої в контролі. Імуногістохімічне дослідження

дозволило виявити лише поодинокі макрофаги в межах ендо- та екзокринної частини ПЗ, у яких визначалася слабка експресія COX-2.

Таким чином, введення меланіну запобігало порушенню морфогенезу ПЗ у тварин з глутамат-індукованим ожирінням.

Висновки:

1. Введення глутамату натрію викликає розвиток ожиріння зі збільшенням обсягу вісцерального жиру, зростанням кількості в ньому прозапальних макрофагів та підвищенням експресії NF- κ B і TNF α .

2. Під час глутамат-індукованого ожиріння в підшлунковій залозі відбувається гіперплазія інсулярного апарату, асоційована з макрофагальною інфільтрацією і підвищенням експресії COX-2.

3. В екзокринній частині підшлункової залози при MSG-індукованому ожирінні помічено розвиток лейкоцитарної інфільтрації зі збільшенням кількості макрофагів у міжчасточкових перегородках і навколо ацинусів, що супроводжувалося підвищенням активності COX-2 і NF- κ B.

4. Введення меланіну запобігало порушенню морфогенезу підшлункової залози у тварин з глутамат-індукованим ожирінням, нівелюючи активацію прозапальних сигнальних шляхів.

Список використаних джерел:

- Transient cytokine treatment induces acinar cell reprogramming and regenerates functional beta cell mass in diabetic mice / L. Baeyens, M. Lemper, G. Leuckx et al. // *Nat Biotechnol.* – 2014. – Vol. 32(1). – P. 76–83.
- (Re)generating Human Beta Cells: Status, Pitfalls, and Perspectives / L. Baeyens, M. Lemper, W. Staels et al. // *Physiol Rev.* – 2018. – Jul 1. – Vol. 98(3). – P. 1143–1167. doi: 10.1152/physrev.00034.2016
- The islet-acinar axis of the pancreas: more than just insulin / S. G. Barreto, C. J. Carati, J. Toouli et al. // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 2010. – Vol. 299(1). – P. 10–G22.
- Effects of polyphenol compounds melanin on NAFLD/NASH prevention. / N. Belemets, N. Kobylak, O. Virchenko et al. // *Biomed Pharmacother.* – 2017. – Vol. 88. – P. 267–276. doi: 10.1016/j.biopha.2017.01.028.
- Regulation of pancreatic β -cell function and mass dynamics by prostaglandin signaling / B. A. Carboneau, R. M. Breyer, M. Gannon // *J Cell Commun Signal.* – 2017. – Vol. 11(2). – P. 105–116. doi: 10.1007/s12079-017-0377-7.
- Inflammation in obesity and diabetes: islet dysfunction and therapeutic opportunity / M. Y. Donath, E. Dalmás, N. S. Sauter et al. // *Cell Metab.* – 2013. – Vol. 17(6). – P. 860–872.
- Eguchi K. Macrophages and islet inflammation in type 2 diabetes / K. Eguchi, I. Manabe // *Diabetes Obes Metab.* – 2013. – Vol. 15 (s3). – P. 152–158.
- Inflammation, autophagy, and obesity: Common features in the pathogenesis of pancreatitis and pancreatic cancer / I. Gukovsky, N. Li, J. Todoric et al. // *Gastroenterology.* – 2013. – Vol. 144(6). – P. 1199–1209.
- Gumbs A. A. Obesity, pancreatitis, and pancreatic cancer / A. A. Gumbs // *Obes Surg.* – 2008. – 18(9). P. 1183–1187.
- Islet inflammation and fibrosis in a spontaneous model of type 2 diabetes, the GK rat. / F. Homo-Delarche, S. Calderari, J. C. Irminger et al. // *Diabetes.* – Vol. 2006. – Vol. 55(6). – P. 1625–1633.
- Probiotics Supplemented with Omega-3 Fatty Acids are More Effective for Hepatic Steatosis Reduction in an Animal Model of Obesity / N. Kobylak, T. Falalyeyeva, P. Bodnar, T. V. Beregovaya // *Probiotics & Antimicro. Prot.* – 2016. – P. 1–8. doi:10.1007/s12602-016-9230-1.
- Comparative experimental investigation on the efficacy of mono- and multiprobiotic strains in non-alcoholic fatty liver disease prevention / N. Kobylak, T. Falalyeyeva, O. Virchenko et al. // *BMC Gastroenterology.* – 2016. – Vol. 16, Issue 1, № 34. – 9 p.
- Pancreatic fat accumulation, fibrosis, and acinar cell injury in the Zucker diabetic fatty rat fed a chronic high-fat diet / A. Matsuda, N. Makino, T. Tozawa et al. // *Pancreas.* – 2014. – Vol. 43(5). – P. 735–743.
- Age-associated changes of islet endocrine cells and the effects of body mass index in Japanese / H. Mizukami, K. Takahashi, W. Inaba et al. // *J Diabetes Investig.* – 2014. – Vol. 5(1). – P. 38–47.
- Morris D. L. Minireview: Emerging concepts in islet macrophage biology in type 2 diabetes / D. L. Morris // *Mol. Endocrinol.* – 2015. – Vol. 29(7). – P. 946–962.
- Lipotoxicity causes multisystem organ failure and exacerbates acute pancreatitis in obesity / S. Navina, C. Acharya, J. P. DeLany et al. // *SciTransl Med.* – 2011. – Vol. 3(107). – P. 107–110.
- Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes / J. Rahier, Y. Guiot, R. M. Goebbels et al. // *Diabetes Obes Metab.* – 2008. – Vol. 10 (Suppl. 4). – P. 32–42.

18. Alterations of Pancreatic Islet Structure, Metabolism and Gene Expression in Diet-Induced Obese C57BL/6J Mice [Electronic resource] / R. Roat, V. Rao, N. M. Doliba et al. // *PLoS ONE.* – 2014. – Vol. 9(2): e86815. – Access mode : <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086815>

19. Increased immune cell infiltration of the exocrine pancreas: A possible contribution to the pathogenesis of type 1 diabetes. / T. Rodriguez-Calvo, O. Ekwall, N. Amiran et al. // *Diabetes.* – 2014. – Vol. 63(11). – P. 3880–3890.

20. Beta-cell mass and turnover in humans: Effects of obesity and aging / Y. Saisho, A. E. Butler, E. Manesso et al. // *Diabetes Care.* – 2013. – Vol. 36(1). – P. 111–117.

21. Saisho Y. Pancreas Volume and Fat Deposition in Diabetes and Normal Physiology: Consideration of the Interplay Between Endocrine and Exocrine Pancreas / Y. Saisho // *Rev. Diabet Stud.* – 2016. – Vol. 13(2-3). – P. 132–147. doi: 10.1900/RDS.2016.13.132

22. Saisho Y. Beta cell dysfunction: Its critical role in prevention and management of type 2 diabetes / Y. Saisho // *World J Diabetes.* – 2015. – Vol. 6(1). – P. 109–124.

23. Cyclooxygenase-2 is overexpressed in chronic pancreatitis. / W. Schlosser, S. Schlosser, M. Ramadani et al. // *Pancreas.* – 2002. – № 25. – P. 26–30

24. Sulaieva O. Sex differences in metabolic control and obesity. / O. N. Sulaieva, N. I. Belemets // *World of Medicine and Biology.* – 2017. – № 13 (61). – P. 185–189

25. Secretory function of white adipose tissue and adipokines: biological effects and clinical significance / O. Sulaieva, Y. Chereshneva, N. Kartashkina et al. // *Georgian Med News.* – 2018. – Jan.(274). P. 116–124.

26. Short-term high-fat feeding induces islet macrophage infiltration and β -cell replication independently of insulin resistance in mice / D. C. Woodland, L. Wei, L. Jacky et al. // *Am J Physiol Endocrinol Metab.* – 2016. – Vol. 311(4). – E763–E771. doi: 10.1152/ajpendo.00092.2016

27. Xavier G. S. X. The Cells of the Islets of Langerhans / G. S. X. Xavier // *J Clin Med.* – 2018. – Vol. 7(3). – P. 54. doi: 10.3390/jcm7030054

28. Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas / X. Xu, J. D'Hoker, G. Stange et al. // *Cell.* – 2008. – Vol. 132(2). – P. 197–207.

29. Yang W. Genetic Epidemiology of Obesity / W. Yang, T. Kelly, J. He // *Epidemiol Rev.* – 2007. – Vol. 29 (1). – P. 49–61.

30. Selective beta-cell loss and alpha-cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea / K. H. Yoon, S. H. Ko, J. H. Cho et al. // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2003. – Vol. 88(5). – P. 2300–2308.

References:

- Baeyens L., Lemper M., Leuckx G. [et al.] Transient cytokine treatment induces acinar cell reprogramming and regenerates functional beta cell mass in diabetic mice // *Nat Biotechnol.* – 2014. – Vol. 32(1). – P. 76–83.
- Baeyens L., Baeyens L., Lemper M., Staels W. [et al.] (Re)generating Human Beta Cells: Status, Pitfalls, and Perspectives // *Physiol Rev.* – 2018. – Jul 1. – Vol. 98(3). – P. 1143–1167. doi: 10.1152/physrev.00034.2016
- Barreto S., Carati C., Toouli J. [et al.] The islet-acinar axis of the pancreas: more than just insulin // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 2010. – Vol. 299(1). – G10–G22.
- Belemets N., Kobylak N., Virchenko O. [et al.] Effects of polyphenol compounds melanin on NAFLD/NASH prevention. // *Biomed Pharmacother.* – 2017. – Vol. 88. – P. 267–276. doi: 10.1016/j.biopha.2017.01.028.
- Carboneau B., Breyer R., Gannon M. Regulation of pancreatic β -cell function and mass dynamics by prostaglandin signaling // *J Cell Commun Signal.* – 2017. – Vol. 11(2): 105–116. Published online 2017 Jan 28. doi: 10.1007/s12079-017-0377-7.
- Donath M., Dalmás E., Sauter N. [et al.] Inflammation in obesity and diabetes: islet dysfunction and therapeutic opportunity // *Cell Metab.* – 2013. – Vol. 17(6). – P. 860–872.
- Eguchi K., Manabe I. Macrophages and islet inflammation in type 2 diabetes // *Diabetes Obes Metab.* – 2013. – Vol. 15 (s3). – P. 152–158.
- Gukovsky I., Li J. [et al.] Todoric Inflammation, autophagy, and obesity: Common features in the pathogenesis of pancreatitis and pancreatic cancer // *Gastroenterology.* – 2013. – Vol. 144(6). – P. 1199–1209.
- Gumbs A. Obesity, pancreatitis, and pancreatic cancer. *Obes Surg.* 2008;18(9):1183–1187.
- Homo-Delarche F., Calderari S., Irminger J. [et al.] Islet inflammation and fibrosis in a spontaneous model of type 2 diabetes, the GK rat. // *Diabetes.* – Vol. 2006. – Vol. 55(6). – P. 1625–1633.
- Kobylak N., Falalyeyeva T., Bodnar P., Beregovaya T. Probiotics Supplemented with Omega-3 Fatty Acids are More Effective for Hepatic Steatosis Reduction in an Animal Model of Obesity // *Probiotics & Antimicro. Prot.* – 2016. – P. 1–8. doi:10.1007/s12602-016-9230-1.
- Kobylak N., Falalyeyeva T., Virchenko O. [et al.] Comparative experimental investigation on the efficacy of mono- and multiprobiotic strains in non-alcoholic fatty liver disease prevention // *BMC Gastroenterology.* – 2016. – Vol. 16, Issue 1, № 34. – 9 p.
- Matsuda A., Makino N., Tozawa T. [et al.] Pancreatic fat accumulation, fibrosis, and acinar cell injury in the Zucker diabetic fatty rat fed a chronic high-fat diet // *Pancreas.* – 2014. – Vol. 43(5). – P. 735–743.
- Mizukami H., Takahashi K., Inaba W. [et al.] Age-associated changes of islet endocrine cells and the effects of body mass index in Japanese // *J Diabetes Investig.* – 2014. – Vol. 5(1). – P. 38–47.
- Morris D. Minireview: Emerging concepts in islet macrophage biology in type 2 diabetes // *Mol. Endocrinol.* – 2015. – Vol. 29(7). – P. 946–962.

16. Navina S., Acharya C., DeLany J. [et al.] Lipotoxicity causes multi-system organ failure and exacerbates acute pancreatitis in obesity // *Sci Transl Med.* – 2011. – Vol. 3(107). – P. 107–110.
17. Rahier J., Guiot Y., Goebbels R. [et al.] Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes // *Diabetes Obes Metab.* – 2008. – Vol. 10 (Suppl 4). – P. 32–42.
18. Roat R., Rao V., Doliba N. [et al.] Alterations of Pancreatic Islet Structure, Metabolism and Gene Expression in Diet-Induced Obese C57BL/6J Mice // *PLoS ONE.* – 2014. – Vol. 9(2): e86815. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086815>
19. Rodriguez-Calvo T., Ekwall O., Amiran N. [et al.] Increased immune cell infiltration of the exocrine pancreas: A possible contribution to the pathogenesis of type 1 diabetes. // *Diabetes.* – 2014. – Vol. 63(11). – P. 3880–3890.
20. Saisho Y., Butler A., Manesso E. [et al.] Beta-cell mass and turnover in humans: Effects of obesity and aging // *Diabetes Care.* – 2013. – Vol. 36(1). – P. 111–117.
21. Saisho Y. Pancreas Volume and Fat Deposition in Diabetes and Normal Physiology: Consideration of the Interplay Between Endocrine and Exocrine Pancreas // *Rev Diabet Stud.* – 2016. – Vol. 13(2-3). – P. 132–147. doi: 10.1900/RDS.2016.13.132
22. Saisho Y. Beta cell dysfunction: Its critical role in prevention and management of type 2 diabetes // *Y. Saisho // World J Diabetes.* – 2015. – Vol. 6(1). – P. 109–124.
23. Schlosser W., Schlosser S., Ramadani M. [et al.] Cyclooxygenase-2 is overexpressed in chronic pancreatitis. // *Pancreas*, 25 (2002), pp. 26–30

24. Sulaieva O., Belemets N. Sex differences in metabolic control and obesity. // *World of Medicine and Biology* 13 (61), 185–189
25. Sulaieva O., Cheresheva Y., Kartashkina N. [et al.] Secretory function of white adipose tissue and adipokines: biological effects and clinical significance. // *Georgian Med News.* 2018 Jan;(274):116–124.
26. Woodland D., Wei L., Jacky L. [et al.] Short-term high-fat feeding induces islet macrophage infiltration and β -cell replication independently of insulin resistance in mice // *Am J Physiol Endocrinol Metab.* – 2016. – Vol. 311(4). – E763–E771. doi: 10.1152/ajpendo.00092.2016
27. Xavier G. The Cells of the Islets of Langerhans // *J Clin Med.* – 2018. – Vol. 7(3). P. 54. Published online 2018 Mar 12. doi: 10.3390/jcm7030054
28. Xu X., D'Hoker J., Stange G. [et al.] Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas // *Cell.* – 2008. – Vol. 132(2). – P. 197–207.
29. Yang W., Kelly T., He J. Genetic Epidemiology of Obesity // *Epidemiol Rev.* – 2007. – Vol. 29 (1). – P. 49–61.
30. Yoon K., Ko S., Cho J. [et al.] Selective beta-cell loss and alpha-cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea // *J. Clin Endocrinol Metab.* – 2003. – Vol. 88(5). – P. 2300–2308.

Надійшла до редколегії 14.09.2018

Отримано виправлений варіант 15.10.2018

Підписано до друку 15.10.2018

Received in the editorial 14.09.2018

Received a revised version on 15.10.2018

Signed in the press on 15.10.2018

Н. Белемєць, асп., Т. Фалалєєва, д-р биол. наук,
Т. Берегова, д-р биол. наук, Л. Остапченко, д-р биол. наук
УНЦ "Інститут біології та медицини",
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
Н. Кобыляк, канд. мед. наук, Е. Курик, д-р мед. наук
Національний медичний університет імені А. А. Богомольця, Київ, Україна,
О. Сулаєва, д-р мед. наук
Патоморфологічна лабораторія "CSD Health Care", Київ, Україна

МОРФОГЕНЕЗ ПОДЖЕЛУДОЧНОЇ ЖЕЛЕЗИ В УМОВАХ ГЛУТАМАТ-ІНДУЦІЙОВАНОГО ОЖИРЕННЯ: МЕХАНІЗМИ КОРРЕКТУЮЩОГО ДІЯВАННЯ МЕЛАНИНА

Ісследование морфогенеза поджелудочной железы у крыс в условиях глутамат-индуцированного ожирения и оценке эффектов меланина при данных условиях. Исследования проведены на 45 новорожденных крыс самца линии Wistar, разделенных на 3 группы по 15 животных в каждой. 1 группа – новорожденным крысам интактной группы подкожно в объеме 8 мкл/г вводили физиологический раствор на 2–10-й день жизни. 2 группа – новорожденным крысам подкожно в объеме 8 мкл/г вводили глутамат натрия (ГН) (4 мг/г) соответственно на 2–10-й день жизни. 3 группа – крысы получали меланин (1 мг/кг), растворенный в воде (0,25 мл/100 г) (внутрижелудочно (в/ж)). Группа ГН соответственно получала 2,5 мл/кг воды (в/ж). Меланин был получен из дрожжеподобных штаммов *Nadsoniellanigra* X1 с Украинской антарктической станции. Введение меланина начинали через 4 недели после рождения и продолжали недельными курсами с перерывами в 2 недели. В течение 4 месяцев после рождения крысы находились на обычном пищевом рационе. 4-месячных животных декапитировали, собирали поджелудочную железу для гистологического и иммуногистохимического исследования. Поджелудочную железу фиксировали в 10 % формалине, обезжировали и заливали парафиновым воском. Парафиновые участки 5 мкм были разрезаны и окрашены гематоксилином и эозином. Поскольку воспаление является одним из ведущих механизмов поражения поджелудочной железы при ожирении, провоспалительные клетки поджелудочной анализировали иммуногистохимической оценкой клеток CD68, экспрессией NF- κ B и TNF- α .

Введение глутамата натрия вызвало развитие ожирения с увеличением объема висцерального жира, ростом количества в нем провоспалительных макрофагов и повышением экспрессии NF- κ B и TNF α . В поджелудочной железе наблюдалась гиперплазия инсулярного аппарата, ассоциированная с макрофагальной инфильтрацией и повышением экспрессии COX-2. Введение меланина предотвращало нарушения морфогенеза поджелудочной железы у животных с глутамат-индуцированным ожирением, нивелируя активацию провоспалительных сигнальных путей.

Ключевые слова: глутамат натрия, ожирение, клетки CD68, экспрессия NF- κ B и TNF- α , меланин.

N. Belemets, PhD-stud., T. Falalyeyeva, DSc, T. Beregova, DSc, L. Ostapchenko, DSc
ESC "Institute of Biology and Medicine", Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
N. Kobylak, PhD, O. Kuryk, DSc
Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine,
O. Sulaieva, DSc
Laboratory of Pathology "CSD Health Care", Kyiv, Ukraine

MORPHOGENESIS OF PANCREAS UNDER THE CONDITIONS OF GLUTAMAT-INDUCED OBESITY: MECHANISMS OF CORRECTION ACTION OF MELANIN

The aim of work was to study the morphogenesis of pancreas in rats with glutamate-induced obesity and to evaluate the effects of melanin under these conditions. We included 45 newborn Wistar male rats, divided into 3 groups of 15 animals each. 1 group – newborns rats of intact group were administered with saline subcutaneously (s.c.) in the volume of 8 μ l/g at 2–10th postnatal days. 2 group – newborns rats of MSG-group received a solution of MSG (4,0 mg/g of body weight) s.c. at 2–10th postnatal days. 3 group – rats received aqueous solution of melanin in dose 1 mg/kg at volume 2,5 ml/kg per os (p.o.). Melanin was obtained from yeast-like fungi *Nadsoniellanigra* X1 strain from Ukrainian Antarctic station. Melanin administration was started at the age of 4 weeks just after wean and continued for 3 months intermittently alternating two-week course of introduction with two-week course of break. Within 4 months after birth, rats had a normal diet. Pancreas tissue was fixed in 10 % formalin, dehydrated and imbedded in paraffin wax. Paraffin sections of 5 μ m were cut and stained with hematoxylin and eosin. As low-grade inflammation is one of the leading mechanisms of pancreas lesion in obesity, the proinflammatory activation of pancreas cells was analyzed by immunohistochemical assessment of CD68 cells, NF- κ B and TNF- α expression.

The injection of glutamate sodium causes the development of obesity with an increase in the amount of visceral fat, an increase in the number of proinflammatory macrophages in it and an increase in the expression of NF- κ B and TNF α . In the pancreas, there is a hyperplasia of the insular apparatus, associated with macrophage infiltration and an increase in the expression of COX-2. The introduction of melanin prevented the morphogenesis of the pancreas in animals from glutamate-induced obesity, leveling the activation of proinflammatory signaling paths.

Key words: monosodium glutamate, obesity, CD68 cells, NF- κ B and TNF- α expression, melanin.