

УДК 616.379-008.64-089

ЭФФЕКТ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ АЛЛОКСАНОВОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ У КРЫС В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Михайличенко В.Ю., Столяров С.С.

Медицинская академия имени С.И. Георгиевского Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского» Министерства образования и науки Российской Федерации, Россия, Республика Крым, г. Симферополь, e-mail: pancreas1978@mail.ru

В статье описано моделирование и течение аллоксанового сахарного диабета у крыс. Авторами отмечены биохимические, гормональные сдвиги в организме животных идентичных изменениям в организме человека с сахарным диабетом 1 типа. В частности происходит снижение концентрации инсулярных и повышение контринсулярных гормонов, данный процесс сопровождается повышением индекса атерогенности крови. При гистологическом исследовании отмечается апоптоз островков Лангерганса поджелудочной железы. Трансплантация культур клеток поджелудочной железы 3 месячного кролика позволяет нормализовать уровень гликемии, достичь нормализации показателей контринсулярных гормонов. В поджелудочной железе крыс отмечается образование новых островков Лангерганса из эпителия протоков поджелудочной железы. В связи с реакцией отторжения данный эффект ослабевал к 60 суткам, что приводило к приближению показателей крови к первоначальным цифрам.

Ключевые слова: аллоксановый диабет, трансплантация, культура клеток поджелудочной железы

EFFECT TRANPLANTATION OF PANCREAS ISLET CELL CULTURES AT ALLOXAN DIABETES AT RATS IN EXPERIMENT

Mikhailichenko V.Yu., Stolyrov S.S.

Medical Academy named after S.I. Georgievskiy, The Federal State Autonomous Educational Establishment of Higher Education "Crimean Federal University named after V.I. Vernadsky" Ministry of Education and Science of the Russian Federation, Russia, Republic of Crimea, Simferopol, e-mail: pancreas1978@mail.ru

In clause the modeling and current alloxan sugar diabetes at rats is described. By the authors are marked biochemical, harmonically shifts in organism of animals that is identical to the changes in a human organism with diabetes mellitus 1 type. Particularly, the concentration of insular hormones declines, but on the contrary contrinsular increases. This process is accompanied by increased blood atherogenic index. Histological examination shows apoptosis of Langerhans islets in the pancreas. The transplantations of pancreas islet cell cultures of 3 monthly rabbits allows to normalize a level of glucose in the blood, to achieve normalization of parameters contrinsulations hormones. In connection with reaction graft resection this effect weakened by 60 to day, that resulted in approach parameters of the blood to initial figures. In the rats pancreas the formation of new Langerhans islets from the epithelium of the pancreatic ducts come.

Key words: alloxan diabetes, transplantation, pancreas islet cell cultures

Несмотря на значительные успехи достигнутые в современной диабетологии, ряд вопросов остаются открытыми, что требует дальнейшего изучения данной патологии и совершенствования путей ее коррекции. Большое значение для выявления вопросов патогенеза, клиники, лечения и профилактики заболевания имеет экспериментальная диабетология. Экспериментальные модели сахарного диабета позволяют получить ценные сведения не только для понимания патофизиологии заболевания, но и механизма антидиабетического действия различных препаратов с целью направленного их применения [1, 2, 4]. Аллоксановая модель сахарного диабета у животных является оптимальным на современном уровне развития экспериментальной диабетологии, т.к. полностью соответствует патогенезу сахарного диабета у человека [2, 3, 5].

Исследования проводились на 40 белых половозрелых лабораторных крысах самцах массой 200-250г, содержащихся в обычных условиях вивария. Сахарный диабет вызывали путем подкожного введения раствора аллоксана тетрагидрата из расчета 20 мг на 100 г массы тела, предварительно 2 суток голодавшим животным. Раствор аллоксана готовили путем разведения кристаллического субстрата Alloxan Tetrahydrate фирмы Fluka-Sigma (Германия) в стерильной дистиллированной воде. После растворения кристаллов вещества, стерильность раствора добивались путем пропускания его через мембрану Millex-GV с фильтром 0,22 µm фирмы MILLIPORE (Франция) и помещали в стерильные закатанные флаконы.

Материалом для приготовления культуры клеток поджелудочной железы служила

поджелудочная железа 3 месячного кролика породы шиншилла. В стерильных условиях экспериментального операционного блока у кролика под внутримышечным наркозом Ketamine+Xylazine в пропорции 40+7,5 мг/кг, выполняли верхнесрединную лапаротомию, мобилизовали поджелудочную железу, пунктировали главный проток поджелудочной железы кролика и вводили 0,25% раствор трипсина. После чего железу немедленно вынимали из организма животного и помещали в стерильный раствор среды S 199 с антибиотиком и передавали для дальнейшей обработки в Лабораторию клеточного и тканевого культивирования ИНВХ им.В.К. Гусака.

Биохимические показатели крови определяли с помощью стандартных наборов «Lachema» (Czech republic). Для исследования гормонального статуса кровь забирали в количестве 5 мл в условиях основного обмена утром натощак. Немедленно после взятия крови ее переливали из шприца в стеклянную центрифужную пробирку объемом 10 мл. Предварительно в пробирку добавляли 0,5мл консервирующего раствора и охлаждали ее на ледяной бане. Кровь центрифугировали в течение 30 мин с ускорением не менее 3000g при температуре +40С на рефреджираторной центрифуге К-23 (Германия). Полученную плазму тубировали в заранее промаркированные пластиковые тубы типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл, в которых хранили (не более 3-4 недель) при температуре -700С. Определение содержания инсулина, кортизола, тироксина и трийодтиронина, тестостерона проводили радиоиммунологическим методом с использованием стандартных коммерческих наборов реактивов фирмы «Immunotech» (Чехия. Статистическую обработку полученных данных выполняли на компьютере Pentium V с помощью программ «Microsoft Excel 10», «Statistica 6.0».

После введения диabetогенных доз аллоксана наблюдалось несколько фаз изменений сахарной кривой в крови: первая фаза – гипергликемическая, достигающая максимума в течение первых 2-4 часов; вторая – гипогликемическая, которая в основном проявлялась на протяжении 15-24 часов, и наконец третья фаза – фаза стойкой гипергликемии.

Первые признаки диабета проявлялись в виде резкого увеличения суточного потребления воды (более 120 мл), полифагией, полиурией, гипергликемией, резкой потери в весе, выпадении волосяного покрова. В разные сроки эксперимента развивались трофические язвы голени, гангрена с самоампутацией хвоста. Около 15 % живот-

ных погибло в результате гипергликемической или гипогликемической комы в разные сроки развития аллоксанового диабета.

Изменение концентрации инсулина крови определяли с помощью радиоиммунологического анализа с использованием стандартных коммерческих наборов реактивов фирмы «Immunotech» (Чехия) – в норме – 4,8±0,3; 1 сутки – 35,6±0,25; 3 сутки – 12,4±0,23; 21 сутки 2,2±0,27; 60 сутки – 2,1±0,31 мкМЕ\мл при p<0,05. В первые сутки развития заболевания отмечается прирост концентрации контринсулярных гормонов: тироксина и кортизола, снижение содержания трийодтиронина и тестостерона. К 7-11 суткам отмечается понижение концентрации общего трийодтиронина и общего тироксина, снижение кортизола и прирост содержания тестостерона. В более поздние сроки (45-60 сутки) отмечается достоверный прирост концентрации тестостерона и кортизола, а также дисбаланс остальных гормонов. Глюкоза крови составила: в норме 4,3±0,8; 1 сутки 35,8±0,12; 3 сутки 26,9±0,35; 21 сутки - 23±0,24; 60 сутки – 22,6±0,22 ммоль/л (p<0,05). При исследовании мочи: удельный вес – 1,03; pH – 6; глюкоза – 17 ммоль/л; белок – 100 мг/дцЛ.

Инсулиновая недостаточность при аллоксановом диабете приводит к усиленному распаду тканевых белков, повышенному поступлению в кровь аминокислот, увеличению общего азота. Характерным нарушением липидного обмена является повышение содержания в сыворотке бета-липопротеидов (ЛПНП) до 41,7 % (в норме до 19,9 %), триглицеридов до 1,03 ммоль/л (в норме до 0,47 ммоль/л), при p<0,05, а также снижение содержания альфа-холестерина (ЛПВП) с 38,1 % (норма) до 12,8%. Повышение в крови ЛПНП при снижении уровня липопротеидов высокой плотности приводят к развитию атеросклероза, что наблюдалось у животных при гистологическом исследовании крупных сосудов.

При гистологическом исследовании животных с аллоксановым диабетом отмечается прежде всего повреждение островков поджелудочной железы. Резко уменьшается их количество, островки приобретают деформированную форму с явным уменьшением клеточного состава.

Животные в опыт брались через 6 месяцев после введения аллоксана, условно выделяли 3 степени тяжести течения сахарного диабета: легкая – концентрация глюкоза крови была в пределах 10 ммоль/л, средняя - 10-15 ммоль/л, тяжелая – 15 и более. Для трансплантации культур клеток поджелудочной железы использовали 2 группы жи-

вотных, по 10 в каждой: 1 группа животные с сахарным диабетом средней степени тяжести, 2 группа – тяжелая. Уровень инсулина, глюкозы исследовали через 12 часов и на 1, 5, 10, 30 и 60 сутки после трансплантации. Трансплантацию клеточно-тканевых культур поджелудочной железы крысам производили в переднюю брюшную стенку, толстой иглой в верхний квадрант живота.

Снижение уровня глюкозы отмечали через 2-4 часа после трансплантации, которое сопровождалось повышением уровня инсулина крови до $12,301 \text{ мкМЕ/мл}$ и уровня С-пептида до $0,499 \text{ нг/мл}$. В дальнейшем через 3 суток уровень инсулина повышался до $23,117 \text{ мкМЕ/мл}$, а С-пептид – до $0,52 \text{ нг/мл}$, к 60 суткам уровень инсулина был на уровне $2,69 \pm 0,2 \text{ мкМЕ/мл}$, а уровень С-пептида $1,32 \pm 0,24 \text{ нг/мл}$. Параллельно наблюдалось снижение уровня кортизола с $240,9$ до $14,46 \text{ нмоль/л}$, общего трийодтиронина с $1,28$ до $0,11 \text{ нмоль/л}$, повышение общего тироксина с $21,09$ до $128,85 \text{ нмоль/л}$. В биохимических анализах отмечалось снижение уровня глюкозы до $6,0 \text{ ммоль/л}$ в 1 группе и до $7,3 \text{ ммоль/л}$ во 2 группе. Так же снижалась концентрация триглицеридов до $0,48 \text{ ммоль/л}$, повышалось содержание ЛПВП до $34,3\%$, хотя уровень ЛПНП оставался практически неизменен. Данный эффект наблюдался до 3 месяцев, затем постепенно уменьшался и приближался к первоначальным значениям, что свидетельствует об отторжении трансплантата. Регенерация ткани поджелудочной железы осуществляется по всей вероятности за счет паракринного эффекта клеточного трансплантата, который осуществляется в результате выделения биологически активных веществ, направленных на стимуляцию восстановления островков Лангерганса.

Выводы

Аллоксановый диабет сопровождается изменениями в организме животного характерных для сахарного диабета I типа человека, в частности гипергликемия сопровождается снижением уровня инсулярных гормонов и повышением концентрации контринсулярных. Помимо прочего отмечается дисбаланс в обмене липопротеидов, что отражается в повышении индекса атерогенности и гистологической картине сосудов характерных для диабетической ангиопатии. В поджелудочной железе отмечается в большом количестве апоптотические тельца в области бывших островков

поджелудочной железы. Трансплантация культур клеток поджелудочной железы кролика позволяет в должной мере корригировать уровень гликемии при сахарном диабете у крысы. Трансплантация культуры клеток сопровождается эндокриннокорригирующим эффектом контринсулярных гормонов, что позволяет не только за счет повышения концентрации инсулина и С-пептида уменьшить уровень гликемии, а также стабилизацию биохимических показателей, при гистологическом исследовании отмечалось пролиферация сохранившихся островков поджелудочной железы и преобразование протоковых клеток в эндокринные. Использование культуры клеток поджелудочной железы 3 месячного кролика позволяют наблюдать эффект работы трансплантата в течении 90 суток, а затем наблюдается отторжение трансплантата с его склерозом, что приводит к возвращению показателей крови к первоначальным цифрам. Таким образом, трансплантация культуры клеток поджелудочной железы кролика у крыс с аллоксановым диабетом, позволяет добиться стабилизации гормональных и биохимических показателей, однако данный эффект недолговременный и связан по всей вероятности с склерозом трансплантата и ослабления его эндокриннокорригирующего эффекта, за счет выработки инсулина. Регенерация собственной ткани поджелудочной железы незначительна, что не позволяет в полной мере компенсировать инсулиновый обмен.

Список литературы

1. Жилюк В.И. Значение эндотелиотропных и антиагрегантных свойств в нейропротективном действии праирацетама при аллоксановом диабете / В.И. Жилюк, В.И. Мамчур, А.Э. Левых // Патология. 2010. №1. С. 56-58.
2. Михайличенко В.Ю. Хирургическое лечение экспериментального сахарного диабета / В.Ю. Михайличенко // Вестник неотложной и восстановительной медицины. 2002. Т. 3, №3. С. 465-467.
3. Можейко Л.А. Экспериментальные модели для изучения сахарного диабета часть I. аллоксановый диабет / Л.А. Можейко // Журнал гродненского государственного медицинского университета. 2013. № 3. С. 26-29.
4. Трансплантация культуры клеток поджелудочной железы при аллоксановом диабете (сообщение 1) / О.И. Мишиношвили, В.Ю. Михайличенко, А.Г. Попандупуло и др. // Вестник неотложной и восстановительной медицины. 2003. Т.4. №3. С. 530-533
5. Черкасова О.П. Активность 11 β -гидроксистероиддегидрогеназы в надпочечниках, печени и почках крыс с экспериментальным диабетом / В.Г. Селятицкая, Н.А. Пальчикова, Н.В. Кузнецова, О.П. Черкасова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. -2013. №8. С. 26-28.