

Вплив трансплантації культур клітин на відновлення ендокринної частини підшлункової залози за експериментального цукрового діабету

А. Й. Мазуркевич*, В. В. Ковпак, О. С. Ковпак

<https://doi.org/10.31174/SEND-NT2018-157V117-22>

Національний університет біоресурсів і природокористування України, м. Київ, Україна

*Corresponding author. E-mail a.mazurkevich@nubip.edu.ua

Paper received 27.01.18; Accepted for publication 05.02.18.

Анотація. У тканинах дорослого організму, окрім спеціалізованих клітин, містяться незрілі, недиференційовані і низькодиференційовані клітин, так звані стовбурові. Не виключенням є кістковий мозок, жирова тканина та підшлункова залоза. Саме ці клітини здатні до адгезії та проліферації в умовах *in vitro* утворюючи клітинні культури. У статті описано вплив культур клітин отриманих з різних тканин (підшлункова залоза, кістковий мозок та жирова тканина) на перебіг експериментального цукрового діабету у щурів. Досліджено, що оптимальним методом введення клітинного матеріалу, є трансплантація його під капсулу підшлункової залози. Встановлено, що після введення культури клітин отриманих із перерахованих вище тканин, у тварин-реципієнтів із експериментальним цукровим діабетом настає позитивний терапевтичний ефект у вигляді збільшення загального об'єму острівкової тканини (у порівнянні з контрольною групою), зниження рівня глюкози у сироватці крові.

Ключові слова: культура клітин, цукровий діабет, кістковий мозок, жирова тканина, підшлункова залоза, острівці Лангерганса.

Вступ. Головним патогенетичним фактором у розвитку інсулінозалежного цукрового діабету є зменшення кількості β -клітин підшлункової залози, що призводить до зниження рівня інсуліну у крові. Тому патогенетичне лікування цукрового діабету має бути спрямоване на відновлення острівців Лангерганса. Трансплантація стовбурових клітин є одним із перспективних методів лікування цукрового діабету, оскільки сприяє відновленню острівкового апарату підшлункової залози. У той час науковцями найчастіше розглядається три джерела стовбурових клітин, які використовуються у терапії цукрового діабету – мезенхімальні стовбурові клітини кісткового мозку та жирової тканини та регіональні – з підшлункової залози [1, 3, 6, 10].

Короткий огляд публікацій по темі. Цукровий діабет – це група метаболічних захворювань, що характеризуються підвищеним вмістом глюкози в крові (гіперглікемія) в результаті недостатньої секреції інсуліну, його активності або обох цих факторів. Як відомо, інсулін, що виробляється β -клітинами підшлункової залози, активує процеси засвоєння глюкози клітинами. За цукрового діабету 1 типу нестача інсуліну в організмі потребує щоденного поповнення його у вигляді ін'єкцій [9]. Проте тривале використання цього методу замісної терапії, а також гіпоглікемічних препаратів може призвести до розвитку у тварин інсулінорезистентності та розвитку макро- і мікровазкулярних ускладнень [3, 12].

Тому увага багатьох науковців спрямована на пошук методів лікування цукрового діабету шляхом відновлення острівців Лангерганса. Використання стовбурових клітин та продуктів клітинних технологій є перспективним напрямком лікування цукрового діабету, оскільки спрямоване на регенерацію острівкового апарату підшлункової залози [1, 6, 10].

Мета: дослідити вплив трансплантації культур клітин кісткового мозку, жирової тканини та підшлункової залози на активність відновлення клітинного складу острівкового апарату підшлункової залози та нормаліза-

ції рівня глюкози у крові тварин за експериментального цукрового діабету.

Завдання: отримати культури клітин кісткового мозку (КККМ), жирової тканини (ККЖТ) та підшлункової залози (ККПЗ); сформувати експериментальний алоксановий цукровий діабет у щурів; визначити оптимальний метод введення клітинного матеріалу; провести морфометричне дослідження стану острівкового апарату за трансплантації культур клітин на фоні цукрового діабету; проаналізувати отримані результати.

Матеріали та методи. В досліді використано 30 клінічно здорових самців білих нелінійних щурів масою тіла 200–250 г, віком 4–5 місяців та 9 білих нелінійних щуренят 12-денного віку. Умови утримання тварин та їх використання в експериментах відповідають вимогам Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (ст. 230 від 2006 року) та Положенням Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 18 березня 1986 р.).

Культури клітин для досліджень отримували із тканин кісткового мозку трубчастих кісток, жирової тканини щурів віком 4–5 місяців та підшлункової залози щуренят віком 12 діб. Культивування клітин здійснювали за стандартною методикою у CO₂-інкубаторі [5].

Експериментальну модель цукрового діабету відтворювали шляхом одноразового підшкірного введення алоксану моногідрату (Sigma, США) в дозі 150 мг/кг у вигляді 5 % розчину в цитратному буфері, рН 4,5 після попередньої 24-годинної депривації їжі з вільним доступом до води. Після введення алоксану тваринам впродовж 24 год після індукції діабету замість води задавали 5 % розчин глюкози з метою попередження їх загибелі внаслідок гіпоглікемічного шоку [2].

Для дослідження міграційної здатності клітин, тваринам-реципієнтам з алоксановим цукровим діабетом трансплантували 2 млн. (у об'ємі 50 мкл) клітин культури кісткового мозку, попередньо оброблених вітальним ядерним барвником Hoechst 33258 (Sigma, США); мічені

в такий спосіб клітини флуоресціюють яскраво зеленим кольором) [8]. Культуру клітин вводили двома шляхами: внутрішньовенно та під капсулу підшлункової залози. Тваринам контрольної групи вводили плацебо (фосфатно-буферний розчин).

На 8 добу тварин виводили з досліду методом евтаназії після попереднього наркотизування та відбирали зразки підшлункової залози для цитологічних досліджень. Виявлення клітин проводили у криозрізах [7, 4]. Зразки досліджували під флуоресцентним мікроскопом Leica DMR (Німеччина).

На 50 добу експерименту (30 добу після трансплантації клітин) у тварин дослідної та контрольної групи проводили відбір проб тканин для гістологічних досліджень. З цією метою відібрані зразки тканин фіксували у 10% розчині нейтрального формаліну протягом 24 годин, далі зневоднювали та заливали в парафін [11]. Зрізи завтовшки 5 мкм виготовляли за допомогою ротатійного мікротома HM 320 E (MICROM, Німеччина) та системи переносу зрізів (STS, MICROM, Німеччина). Для дослідження мікроструктури тканин зрізи фарбували гематоксиліном та еозином [11] після чого препарати піддавали світловій мікроскопії.

Оцінку й аналіз препаратів здійснювали за допомогою мікроскопа Leica DMR (Німеччина) на забарвлених

препаратах. Підраховували загальну кількість острівців на 10 мм² у зрізі, додатково визначали кількість клітинних ядер у острівцях. Дослідження проводили на 3 несерійних зрізах, зроблених із відступом 0,5 мм один від одного (відстань більша, ніж розмір одного острівця).

Результати та їх обговорення. Однією із біологічних властивостей стовбурових клітин є їх здатність мігрувати в зону патологічного процесу. Відомо, що після трансплантації МСК в організм дорослої здорової тварини до 25 % донорського матеріалу виявляють у червоному кістковому мозку [14]. В роботі Wu з колегами показано, що ендогенні МСК мігрують в зону відторгнення аlogenного трансплантату [13]. Вважають, що міграція стовбурових клітин в зону патологічного процесу регулюється продуктами запалення – цитокінами та хемокінами. В той же час, механізм міграції в зону пошкодження вивчений недостатньо, тому одним із наших завдань було дослідити міграційну здатність культури клітин кісткового мозку залежно від способу їх уведення в організм тварини-реципієнта.

Під час дослідження нами порівнювалася здатність клітин до міграції у підшлункову залозу під час трансплантації клітин під її капсулу та внутрішньовенному введенні. Результати оцінювали шляхом виявлення мічених клітин у криозрізах підшлункової залози (рис.1.).

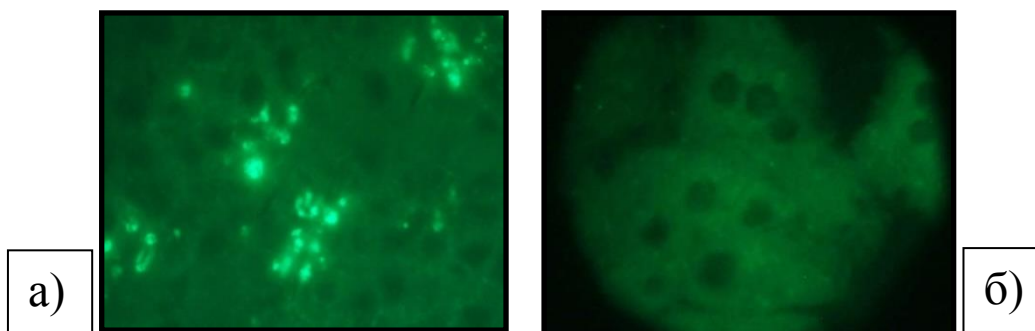


Рис. 1 Виявлення у підшлунковій залозі клітин мічених Hoechst: а) трансплантація під капсулу; б) контроль. Криозрізи, флуоресцентна мікроскопія, 36×1000.

Після трансплантації тваринам з експериментально сформованим цукровим діабетом культури клітин кісткового мозку під капсулу підшлункової залози спостерігали їх розміщення в тканині у вигляді дифузних осередків (рис. 1, а). Отримані результати свідчать про те що трансплантовані клітини не лише зберігають свою життєздатність впродовж тривалого часу після введення, а й мігрують у товщу пошкодженого органа. В групі тварин, яким трансплантували клітини, мічені Hoechst шляхом внутрішньовенного введення, виявлені лише поодинокі сигнали, що свідчить про низьку ефективність цього методу. Тому в подальших дослідженнях використовували метод трансплантації культур клітин під капсулу підшлункової залози.

Наступним кроком у наших дослідженнях було порівняння морфометричних даних підшлункової залози щурів за алоксанового цукрового діабету без лікування (контрольна група) та за трансплантації різних видів культур клітин.

Варто зазначити, що при макроскопічній оцінці підшлункової залози інтактної, контрольної та дослідних груп тварин відмінностей не відмічали.

При гістологічному дослідженні підшлункової залози інтактних щурів було встановлено, що середня кількість острівців на 10 мм² зрізу товщиною 5 мкм становить 9,7±1,0, а середня кількість клітин у острівці Лангерганса – 100,0±14,9 (табл.1.).

Таблиця 1. Вплив трансплантованих культур клітин на активність відновлення острівкового апарату підшлункової залози у білих щурів із експериментальним алоксановим цукровим діабетом

Група тварин	Середня кількість острівців Лангерганса	Середня кількість клітин у острівці
інтактні тварини	9,7±1,0	100,0±14,9
контрольна група	9,7±1,3	62,5±12,4
після введення КККМ	14,7±1,4*	111,0±13,9*
після введення ККПЗ	17,7±1,9*	78,3±14,0
після введення ККЖТ	10,7±0,8	69,5±10,3

Примітка: *p<0,05; (показники 50 доби алоксанового цукрового діабету порівнювали з показниками інтактних тварин, показники після трансплантації ККПЗ, КККМ та ККЖТ за ЦД порівнювали з показниками 50 доби (контроль)

Як видно із даних, наведених в таблиці, у щурів контрольної групи, яким вводили плацебо, не виявлено змін кількості острівців у порівнянні з інтактними тваринами, проте, середня кількість клітин у острівцях зменшилася у 1,6 рази.

Рівень глюкози у крові тварин контрольної групи на 50 добу експерименту вірогідно знижувався, але в незначній мірі (рис. 2), що вказує на здатність експериментально ушкодженої підшлункової залози в період з 20 до

50 доби експерименту частково перебудувати свою функцію на забезпечення потреб організму необхідною (але мінімальною) кількістю гормону. Це відбувається за рахунок збільшення питомого об'єму β -клітин внаслідок прискорення проліферації острівкових клітин із диференціюванням їх у β -клітини. Однак загальний об'єм острівкової тканини залишається незмінним, неогенезу острівців не спостерігається.

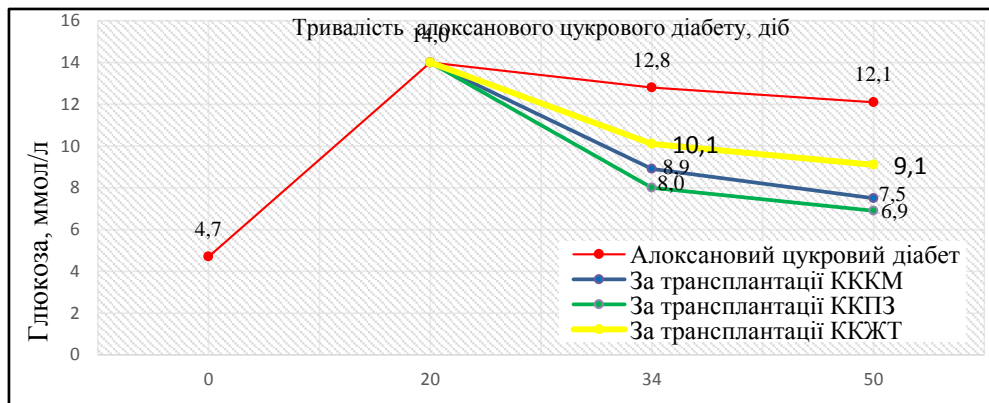


Рис. 2. Рівень глюкози у крові щурів за цукрового діабету на фоні введення культур клітин, $n=5$ ($M\pm m$)

У тварин всіх трьох дослідних груп після трансплантації культури клітин відмічено збільшення середньої кількості острівців підшлункової залози на одиницю площі, у порівнянні з цим показником у тварин контрольної групи. Зокрема, після трансплантації культури клітин підшлункової залози відбувається значне прискорення проліферації клітин у острівцях, що існували до

трансплантації, що у свою чергу призводить до зростання їх площі, і появою нових острівців малого розміру (рис.3, стрілка). На 50 добу експерименту це збільшення вірогідно було у 1,8 рази ($p<0,05$). Збільшення існуючих острівців та поява нових призводить до відчутного і достовірного зростання питомого об'єму острівкової тканини.

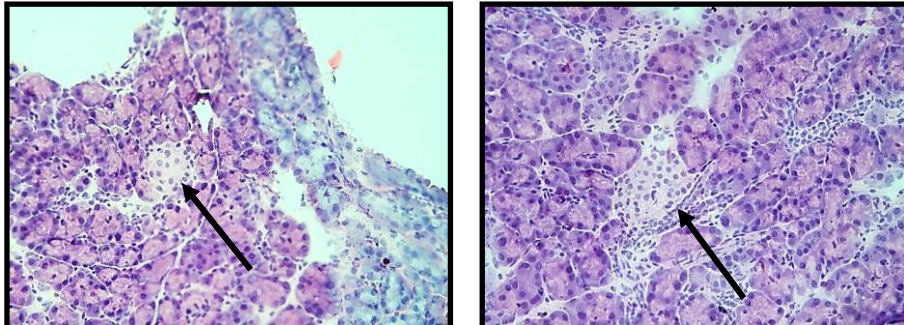


Рис. 3. Поява нових острівців Лангерганса у підшлунковій залозі щурів (вказано стрілками) з експериментальним цукровим діабетом за трансплантації алогенної культури клітин підшлункової залози. Гістопрепарати, фарбування гематоксилін - еозин. Зб. $\times 1000$

Після трансплантації культури клітин кісткового мозку виявлено збільшення як кількості острівців на одиницю площі, у порівнянні із тваринами контрольної групи, так і збільшення їхнього середнього розміру (середня кількість острівців на 10 mm^2 зрізу товщиною 5 мкм збільшилась у 1,5 рази). Зустрічалися як дрібні острівці, так і великі, на 50 добу експерименту деякі з них містили більше 170 клітин. Спостерігається більш виразне прискорення процесів проліферації клітин. За цих умов кількість острівців нижча, ніж в дослідів із трансплантацією культури клітин підшлункової залози, однак розміри окремих острівців набагато збільшуються. Тому питомий об'єм острівкової тканини та кількість інсулін-позитивних клітин на одиницю площі значно збільшуються.

Введення культури клітин жирової тканини також призводить до посилення неогенезу острівців, однак ці

острівці мають невеликий розмір (до 50 клітин). Збільшення питомого об'єму острівкової тканини на одиницю площі було найнижчим порівняно із двома попередніми способами трансплантації.

Висновки:

1. Найбільш ефективним методом відновлення структури та, відповідно, функції підшлункової залози в умовах експериментального аллоксанового цукрового діабету у тварин є трансплантація культури алогенних клітин цієї залози безпосередньо під капсулу підшлункової залози, внаслідок чого посилюються процеси регенерації із збільшенням острівкової тканини в першу чергу шляхом неогенезу острівців, а також за рахунок прискорення регенерації клітин у раніше сформованій острівковій тканині.

2. За трансплантації культури клітин кісткового мозку спостерігається збільшення острівкової тканини в осно-

вному за рахунок посилення проліферативної активності клітин острівців.

3. Трансплантація культури клітин жирової тканини стимулює неогенез острівців Лангерганса у підшлунковій залозі в меншій мірі.

ЛІТЕРАТУРА

1. Алиев М.А., Исмагилов Р.З., Рысбеков М.М. и др. Трансплантация культур островковых клеток поджелудочной железы больным сахарным диабетом // Трансплантология.– 2000.–Т.1, №1.–С.147-151.
2. Жилюк В. І. Аналіз морфометричних та ультраструктурних характеристик гемомікроциркуляторного русла гіпокампу щурів з алоксановим діабетом за умов введення цитиколіну /В. І. Жилюк, В. Й. Мамчур, Н. С. Петрук, А. Е. Левих// Scientific Journal «ScienceRise».–2015.–№7/4(12).– ст. 53-59.
3. Ковальська І.О. Цукровий діабет та трансплантація // Трансплантологія.–2000.–Т.1, №1.–С.140-142.
4. Луппа Х. Основы гистохимии /пер. с немецкого И.Б.Бухвалова, Е.Д.Вальтер – Москва:Мир, 1980, - 343с.
5. Мазуркевич А.Й., Ковпак В. В., Данилов В. Б. Клітинні технології у ветеринарній медицині: навч.посібник для студ. вищ. навч. закладів – К.: КОМПРИНТ – 2014. – 132с.
6. Марков В.О. Нові підходи у комплексному лікуванні цукрового діабету // Одеськ. мед. журнал.–2002.–№2.–С.60-63.
7. Морозова К.Н. Электронная микроскопия в цитологических исследованиях: методическое пособие / Новосиб. гос. ун-т. Новосибирск, 2013. 85 с.
8. Скибо Ю.В., Абрамова З.И. Методы исследования программируемой клеточной гибели: Учебно- методическое пособие для магистров по курсу «Теория апоптоза» /Ю.В. Скибо, З.И.Абрамова. - Казань: ФГАОУ ВПО КФУ, 2011. - 61 с.
9. Шахбазиди Г. Сахарный диабет. Диагностика, классификация, критерии компенсации / Г. Шахбазиди, Д.Д. Дунаева, Г.И. Гордеева // Крымский терапевтический журнал. – 2006. - №2. – ст. 62-66.
10. Hayek A. Cell replacement in type 1 diabetes mellitus // J. Pediatr. Endocrinol. Metab.–2005.–Vol.18, Suppl. 1.–P.1157-1161.
11. Jocelyn H. Histopathologic Techniques. / H. Jocelyn, M.D. Bruce-Gregorios. – Philippines.: Good Will Bookstore, 1974. – 257p.
12. King A., Andersson A., Berit L.S. et al. The role of capsule composition and biologic responses in the function of transplanted microencapsulated islets of Langerhans // Transplantation. – 2003. – Vol.76, №2. – P. 275–279.
13. Wu G.D. Migration of mesenchymal stem cells to heart allografts during chronic rejection/Nolta G.A., Jin Y.S. et.al.//Transplantation 2003.Mar.15; 75(5):679-685.
14. Wynn R.F. A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow/Hart C.A., Corradi-Perini C.//Blood 2004 Nov.1; 104(9) :2643-2645.

REFERENCES

1. M.A.Aliyev, R.Z. Ismagilov, M.M. Rysbekov and others (2000). Transplantation cultures of islet cells of the pancreas to patients with diabetes mellitus. Transplantologiya.1 (1),147-151
2. V. I. Zhilyuk, V. Y. Mamchur, N. S. Petruk & A. Ye. Lëvikh (2015). Analysis of morphometric and ultrastructural characteristics of the hemocirculatory bed of the hippocampus schuris in an alkoxanized diabetes for the minds of cyticholine. 7/4 (12), 53-59.
3. Í.O. Koval's'ka (2000). Diabetes mellitus and transplantation. Transplantology. 1 (1), 140-142.
4. K.H. Luppа Fundamentals of histochemistry, translation from german I.B. Bukhvalova & E.D. Valter. Moscow, World, 1980.
5. A.Y. Mazurkevych, V.V. Kovpak, V.B. Danilov Cell technology in veterinary medicine: a manual for the student. higher tutor institutions. Kiev, Comprinent, 2014.
6. V.O. Markov (2002). New approaches in the complex treatment of diabetes mellitus. Odessa. Medical Journal. 2, 60-63.
7. K.N. Morozova. Electron microscopy in cytological studies: a methodical manual. Novosibirsk State University. Novosibirsk, 2013.
8. YU.V. Skibo & Z.I.Abramova. Methods for the study of programmed cell death: Teaching-methodological manual for masters at the course "Theory of apoptosis". Kazan, FSAEI HE KFU, 2011.
9. G. Shakhbazidi, D.D. Dunayeva & G.I. Gordeyeva (2006). Diabetes mellitus. Diagnosis, classification, compensation criteria. Crimean Therapeutic Journal. 2, 62-66.

The effects of transplantation of cell cultures on the repair of the endocrine pancreas in experimental diabetes mellitus

A. Mazurkevich, V. Kovpak, O. Kovpak

Abstract. In the tissues of an adult organism, in addition to specialized cells, are contained immature, undifferentiated and low-differentiated cells, the so-called stem. Bone marrow, adipose tissue and pancreas are not exception. It is these cells that are capable of adhesion and proliferation under in vitro conditions to form cell cultures. The article describes the influence of various cell cultures (of pancreas, bone marrow, adipose tissue) on the clinical course of experimental pancreatic diabetes of rats. It is found out that the optimal method of cell material injection is its transplantation under the pancreatic capsule. The study of islet cell condition under injecting various cell cultures in the setting of pancreatic diabetes showed that all of them produce a positive therapeutic effect in the treatment of the said pathology. The obtained data is testified by the growth of a general volume of islet tissue of recipient animals (compared to a control set); this in its turn results in the decrease of blood serum glucose level.

Key words: cell culture, pancreatic diabetes, bone marrow, adipose tissue, pancreas, Langerhans islets.

Влияние трансплантации культур клеток на восстановление эндокринной части поджелудочной железы на фоне экспериментального сахарного диабета

A. И. Мазуркевич, В. В. Ковпак, О. С. Ковпак

Аннотация: В тканях взрослого организма, кроме специализированных клеток, содержатся незрелые, недифференцированные и низкодифференцированные клетки, так называемые стволовые. Не исключением является костный мозг, жировая ткань и поджелудочная железа. Именно эти клетки способны к адгезии и пролиферации в условиях *in vitro* образуя клеточные культуры. В статье описано влияние культур клеток полученных из различных тканей (поджелудочной железы, костного мозга и жировой ткани) на течение экспериментального сахарного диабета у крыс. Доказано, что оптимальным методом введения клеточного материала, является трансплантация его под капсулу поджелудочной железы. Установлено, что после введения культуры клеток полученных с перенесенных выше тканей у животных-реципиентов с экспериментальным сахарным диабетом наступает положительный терапевтический эффект в виде увеличения общего объема островковой ткани (по сравнению с контрольной группой), снижение уровня глюкозы в сыворотке крови.

Ключевые слова: культура клеток, сахарный диабет, костный мозг, жировая ткань, поджелудочная железа, островки Лангерганса.