

Влияние аллотрансплантации лимфоцитов селезёнки на развитие сахарного диабета 1 типа

Р.А. Клёсов, В.Н. Каркищенко, О.И. Степанова, Е.Б. Шустов

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

Контактная информация: Клёсов Роман Алексеевич, klesrom@mail.ru

В работе представлены данные по аллотрансплантации спленоцитов от крыс с сахарным диабетом 1 типа генетически здоровым животным, у которых был сформирован симптомокомплекс, соответствующий клиническим, биохимическим и гистологическим проявлениям данного заболевания. Экспериментально доказано наличие переноса иммунной информации в процессе формирования у животных сахарного диабета 1 типа.

Ключевые слова: биомодель, сахарный диабет 1 типа, крысы, спленоциты, лимфоциты.

Введение

Сахарный диабет 1 типа (СД 1 типа) – метаболическое заболевание, характеризующееся гипергликемией, в основе которого лежит деструкция β -клеток, приводящая к абсолютному дефициту инсулина. Разрушение β -клеток (в большинстве случаев – среди людей европейской популяции) имеет аутоиммунную природу (с участием клеточного и гуморального звена иммунной системы) [6].

При манифестации СД 1 типа почти всегда обнаруживается воспалительная реакция в поджелудочной железе – инсулит. Иммуногистохимическое исследование показало [7], что в островках Лангерганса поджелудочной железы крыс с аутоиммунным СД 1 типа среди клеток инфильтрата преобладают Т-лимфоциты, В-лимфоциты, натуральные киллеры и макрофаги. При этом инфильтрат образуется только в тех островках, в которых есть β -клетки. В островках, продуцирующих глюкагон, соматостатин, но не содержащих β -клеток, нет и инфильтрата. Такая локальность, то-

чечность реакции, указывает на то, что причиной ее являются компоненты и свойства, присущие только β -клеткам. Как показывают многие наблюдения, специфичность повреждения β -клеток может быть следствием клеточной аутоиммунной реакции.

Известно, что в условиях хронического патологического процесса во всех органах иммунной системы (костный мозг, тимус и селезенка) [2] наступают морфофункциональные изменения, которые характеризуются развитием вторичного иммунодефицитного состояния с ослаблением клеточного и гуморального иммунитета, цитокиновым дисбалансом, перераспределением иммунных клеток в организме и нарушением их информационной и миграционной активности [3]. При хроническом заболевании в тканеспецифическом повреждении органов активно участвуют Т-лимфоциты. Именно Т-лимфоцитам присуща способность активно участвовать в переносе иммунной информации о патологическом процессе [1].

Целью работы являлась оценка возможности переноса лимфоцитами селезёнки патогенетической иммунной информации генетически здоровым животным и создание аутоиммунной биомодели СД 1 типа.

Материалы и методы

Исследования проводились в ФГБУН НЦБМТ ФМБА России на белых лабораторных крысах-самцах популяции линий Wistar массой $242 \pm 8,3$ г в возрасте 2-3 мес. Животные поступили из филиала «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России и были взяты в эксперимент методом случайной выборки.

Кормление осуществлялось стандартным полнорационнм гранулированным (экструдированным) комбикормом для лабораторных животных ПК-120 ГОСТ Р 51849-2001 Р.5, доступ к воде и корму – свободный. Крыс содержали в микроизоляторной системе RairIsoSystem по 5 особей, при температуре 20-22°C. Содержание животных осуществлялось в соответствии с Правилами надлежащей лабораторной практики (GLP) и Приказом Минздравсоцразвития РФ №708н от 23 августа 2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики». Животные были разделены на контрольную (n=20) и экспериментальную группы (n=25). Исходно все животные были генетически здоровы.

Источником спленоцитов, несущих иммунную информацию о патологическом процессе при формировании СД 1 типа, была группа крыс, у которых предварительно был создан аутоиммунный СД 1 типа [4]. Аутоиммунный процесс формировался путём последовательного введения животным стрептозотоцина и неполного адьюванта Фрейнда. Верификация СД 1 типа была подтверждена

клиническими, биохимическими и гистологическими методами.

Для проведения аллотрансплантации спленоцитов под эфирным наркозом у крыс с моделью СД 1 типа проводили лапаротомию и спленэктомию. Селезенку переносили в стерильный стеклянный гомогенизатор с физиологическим раствором в объеме 15 мл. Тщательно гомогенизировали селезенку до практически полного ее разрушения, затем этот раствор наслаивали на раствор Ficoll-Paque ($1,077 \text{ г/см}^3$). Пробирку центрифугировали в течение 40 мин при 500 об/мин. После центрифугирования супернатант удаляли, клетки (лимфоциты) из интерфазы собирали и ресуспендировали в физиологическом растворе для отмывки от раствора Ficoll-Paque. Производили подсчет выделенных клеток (рис. 1). Выделенные спленоциты вводили внутрибрюшинно [5] в количестве 450-550 тыс. клеток в 0,5 мл физиологического раствора.



Рис. 1. Выделенные и подготовленные для введения Т-лимфоциты (селезенки) крыс с СД 1 типа, ув. x200.

Для выявления клинических, биохимических и гистологических признаков СД 1 типа у экспериментальных животных были проведены исследования в динамике.

Гликозилированный гемоглобин (HbA1c) в крови (5 мкл) определяли на приборе Nycocard REDER II (Норвегия). Тест основан на методе боратного аффинного анализа, диапазон измерения – от 3 до 18%.

Содержание глюкозы в крови измеряли на приборе Ассу-СНЕК (Швейцария). Принцип работы прибора основан на фотометрическом определении уровня глюкозы в свежей капиллярной (венозной) крови. Каплю крови наносили на тест-полоску. Диапазон измерения составлял от 0,6 до 33,3 ммоль/л.

Проводился постоянный контроль массы тела животных и суточного объёма выпитой воды.

Для гистологических исследований использовался микроскоп Nikon Eclipse TS 100 (Япония) с программным обеспечением, срезы окрашивались гематоксилин-эозином.

Результаты и их обсуждение

В ходе исследования было показано, что уже на третью-четвёртую не-

дели после введения спленоцитов у животных экспериментальной группы отмечалось развитие клинических признаков СД 1 типа (полиурия, полифагия, снижение веса). На 4-ю неделю эксперимента замечено достоверное снижение массы тела животных экспериментальной группы ($219 \pm 7,2$ г) по сравнению с животными контрольной группы ($276 \pm 9,6$ г).

Через 3 мес. после аллотрансплантации спленоцитов клинические и морфологические показатели животных экспериментальной группы имели достоверные отличия от таковых, полученных в контрольной группе (повышение уровня глюкозы в крови до $13,5 \pm 0,76$ ммоль/л, в то время как уровень HbA1c оставался в пределах нормы – $4,1 \pm 0,34\%$). К 5-му мес. исследования отмечалось достоверное и значительное повышение уровня глюкозы в крови до $26,3 \pm 0,88$ ммоль/л (рис. 2) и повышение уровня HbA1c до $9,4 \pm 0,25\%$ (рис. 3).

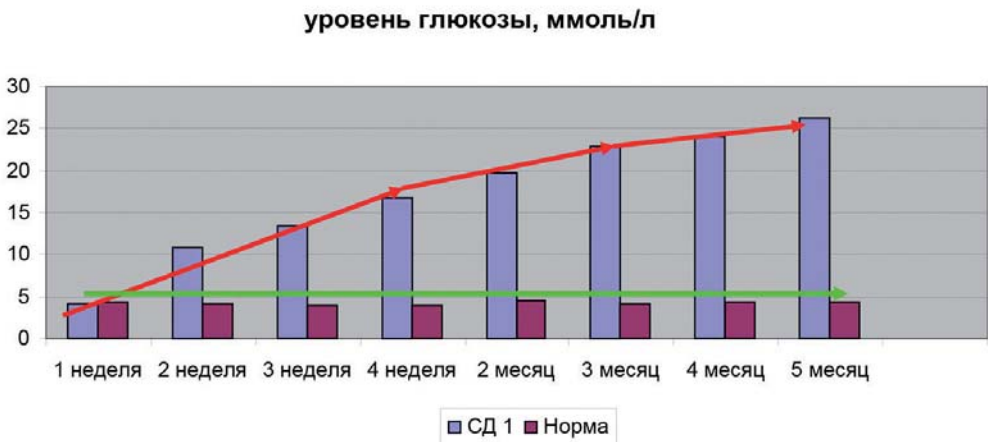


Рис. 2. Динамика изменения содержания глюкозы в крови после аллотрансплантации спленоцитов.

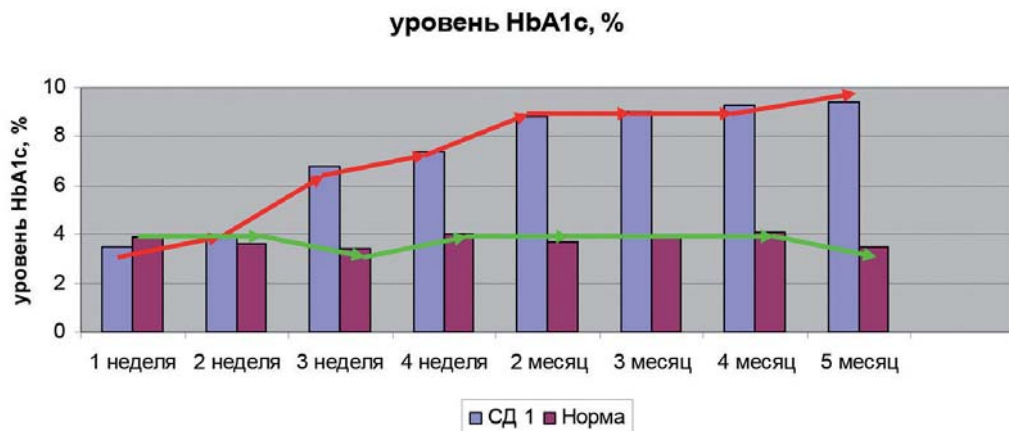


Рис. 3. Динамика изменения HbA1c в крови лабораторных животных после аллотрансплантации спленоцитов.

Масса животных экспериментальной группы уменьшалась на протяжении всего эксперимента: так, к 5-му мес. она составляла $174 \pm 12,5$ г, в то время как у животных контрольной группы – $364 \pm 18,4$ г (рис. 4).

При гистологическом исследовании органов, участвующих в патогенезе СД 1 типа, получены следующие результаты.

В гистологической картине органов животных контрольной группы отличий от нормы не выявлено.

Поджелудочная железа (рис. 5): дольковое строение поджелудочной железы экспериментальных животных сохранено. Экзокринная часть представлена панкреатическими ацинусами, вставочными внутри- и междольковыми протоками, между ацинусами отмечаются сосуды умеренного кровенаполнения (кровеносные капилляры, междольковые артериолы и артерии), единичные нервные стволы. Инсулиновые островки не просматриваются. Протоки поджелудочной железы выст-

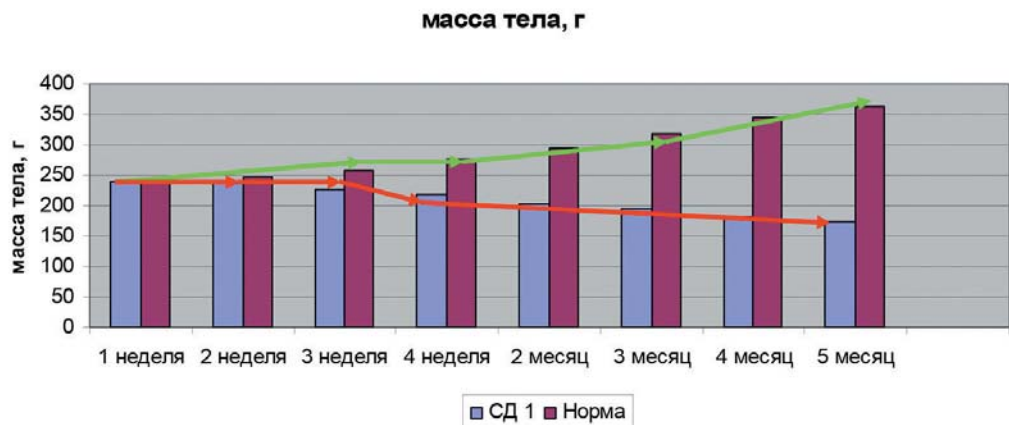


Рис. 4. Динамика изменения массы тела животных после аллотрансплантации спленоцитов.

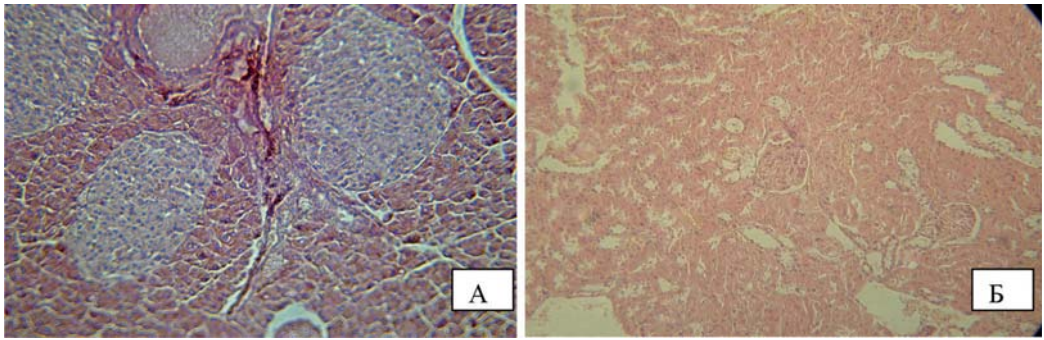


Рис. 5. Ткань поджелудочной железы крыс через 5 мес. после переноса спленоцитов от крыс с аутоиммунным СД 1 типа. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. х200. А – контрольная группа; Б – экспериментальная группа.

ланы однорядным кубическим эпителием с базально-расположенными небольшими ядрами без видимых ядрышек. В некоторых полях зрения умеренное разрастание соединительной ткани в строме с ее разволокнением, перекалибровкой долек.

Печень (рис. 6): полнокровие центральных вен, синусоидов, мелко-, среднекапельная жировая дистрофия гепатоцитов экспериментальных животных. Гепатоциты всех отделов долек в состоянии выраженной, преимущественно мелкокапельной, жировой дистрофии, с признаками пылевидного ожирения гепатоцитов. Отмечаются признаки гибели части гепатоцитов, преимуще-

ственно центральных отделов долек, с кариопикнозом и фрагментацией ядер, появлением гиперплазированных двуядерных гепатоцитов.

Почка (рис. 7): выраженное полнокровие капиллярных петель клубочков, коллапс капиллярных петель клубочков, некроз эпителия дистальных и проксимальных канальцев экспериментальных животных. Эпителий проксимальных и дистальных канальцев некротизирован, слущен в просвет (плазмореक्सис, плазмолизис, кариорексис, кариолизис), отмечаются участки фокального и тотального тубулорексиса. Выраженный отек стромы мозгового вещества, выраженное полнокровие сосудов мозгового

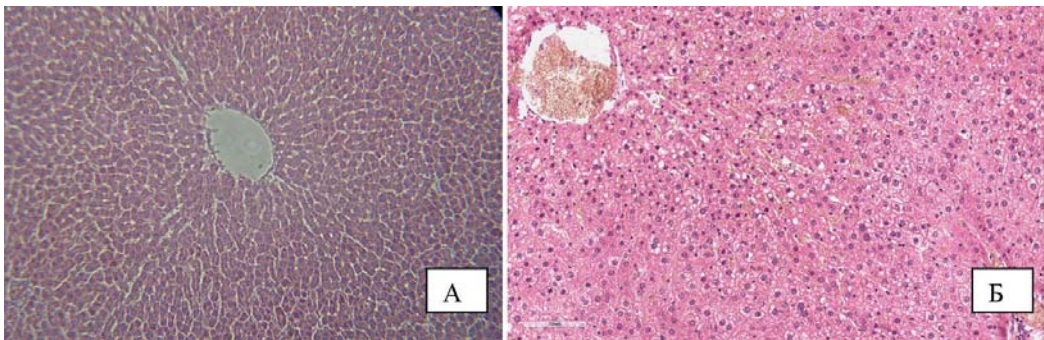


Рис. 6. Ткань печени крыс через 5 мес. после адаптивного переноса спленоцитов от крыс с аутоиммунным СД 1 типа. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. х200. А – контрольная группа; Б – экспериментальная группа.

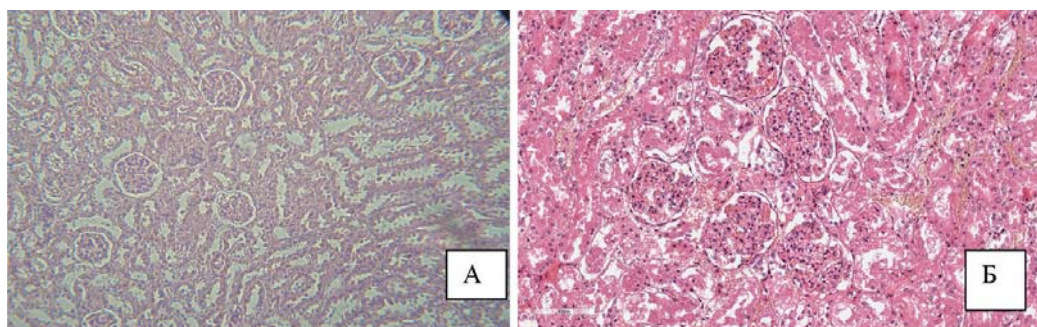


Рис. 7. Ткань почки крыс через 5 месяцев после адаптивного переноса спленоцитов от крыс с аутоиммунным СД I типа. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. х200. А – контрольная группа; Б – экспериментальная группа.

вещества с мелкими и крупными перитубарными кровоизлияниями.

Селезёнка (рис. 8): нарушение гистоструктуры селезёнки экспериментальных животных за счёт обширных участков некрозов без полиморфноклеточной инфильтрации, обширных участков апоптоза, полнокровие сосудов красной пульпы. По периферии селезёночной артерии отмечаются остаточные скопления малых лимфоцитов, полнокровие сосудов красной пульпы, гиалиноз трабекул.

Полученные биохимические и морфологические показатели животных

экспериментальной группы соответствуют типичной картине СД 1 типа.

Выводы

1. Клинические и биохимические исследования, проводившиеся на крысах, перенесших аллотрансплантацию спленоцитов от животных со сформированным аутоиммунным СД 1 типа, выявили стойкие изменения исследуемых показателей, свидетельствующие о развитии СД 1 типа, проявлявшиеся в стойком и достоверном снижении массы животных, стабильной гипергликемии, полидипсии и полиурии.

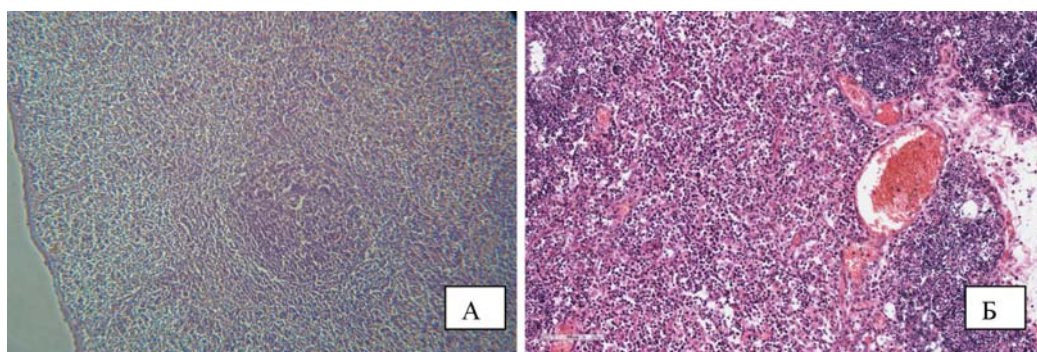


Рис. 8. Ткань селезёнки крыс через 5 мес. после адаптивного переноса спленоцитов от крыс с аутоиммунным СД I типа. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. х200. А – контрольная группа; Б – экспериментальная группа.

2. Типичные для СД 1 типа изменения начинаются через 3-4 недели после аллотрансплантации.

3. Через 5 мес. после аллотрансплантации спленоцитов генетически здоровым животным проявляются структурно-морфологические изменения в поджелудочной железе, почках, печени и селезёнке.

4. Метод аллотрансплантации спленоцитов может быть рекомендован для биомоделирования СД 1 типа у генетически здоровых животных.

Список литературы

1. *Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Зотиков Е.А.* Роль лимфоцитов в оперативном изменении программы развития тканей. - М.: Изд. РАМН, 2009. 107 с.

2. *Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Жданов В.В. и др.* Состояние пулов стволовых клеток при экспериментальном сахарном диабете // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2006. № 3. С. 123-127.
3. *Кветной И.М., Ярилин А.А., Полякова В.О., Князькин И.В.* Нейроиммуноэндокринология тимуса. - СПб. 2005. 157 с.
4. *Клёсов Р.А., Каркищенко В.Н., Степанова О.И., Ревякин А.О.* Оптимизация биомодели сахарного диабета 1 типа // Биомедицина. 2014. № 4. С. 25-30.
5. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. - М.: Профиль-2 С. 2010. 358 с.
6. *Genuth S., et al.* Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus // Diabetes Care. 2003. No. 26. P. 3160-3167.
7. *Yoon J.W., Jun H.S.* Autoimmune destruction of pancreatic beta cells // Am. J. of Therapeutics. 2005. No. 12(6). P. 580-591.

Effect of transplantation of the spleen lymphocytes in the development of type 1 diabetes

R.A. Klesov, V.N. Karkischenko, O.I. Stepanova, E.B. Shustov

The paper presents data on transplantation of splenocytes of rats with type 1 diabetes to genetically healthy animals that have been generated syndrome, appropriate clinical, biochemical and histological manifestations of the disease. Experimentally proved the existence of the transfer immune information in the formation of type 1 diabetes in animals.

Key words: biomodel, type 1 diabetes, rats, splenocytes, lymphocytes.