КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Динамические показатели коррекции клетками костного мозга состояния мышей линии C57BL/KsJYLepr^{db}/+

О.И. Степанова[1], Н.Н. Каркищенко[1], Н.А. Онищенко[2], О.В. Баранова[1]

[1] — Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область
[2] — ФНЦ Трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова Росздравсоцразвития, Москва

Контактная информация: Степанова Ольга Ивановна olsima50@mail.ru

Полученные результаты новы, т.к. впервые применен метод лечения СД 2 типа с помощью аллогенных и изогенных культивированных клеток костного мозга. Метод лечения СД 2 типа впервые выполнен на отечественной генетической модели СД 2 типа, воспроизводящей клинические проявления СД 2 типа у человека. В работе были установлены условия, при которых оптимизируются эффекты лечения с помощью стволовых и прогениторных клеток костного мозга. Показано, что пролонгированный клинический эффект регуляции углеводного обмена и предотвращение глубоких структурных патогенетических нарушений во внутренних органах наступают при использовании клеток костного мозга в раннюю стадию развития СД 2 типа в высоких дозах или многократном применении умеренных доз клеток, что позволяет длительно компенсировать углеводный обмен за счет сохранения адекватной функциональной активности островкового аппарата поджелудочной железы. Эту работу можно рассматривать, как предклинический этап изучения возможности и перспективности применения клеток костного мозга в комплексном лечении СД 2 типа.

Ключевые слова: сахарный диабет 2 типа, мыши db/db, поджелудочная железа, углеводный обмен, клетки костного мозга.

Сахарный диабет (СД) 2 типа относится к числу наиболее распространенных хронических неинфекционных заболеваний в мире и число больных СД продолжает, неуклонно расти. Несмотря на определенные достижения последних лет, современная медикаментозная терапия сахарного диабета по-прежнему не способна надежно препятствовать прогрессированию клинических проявлений СД и его осложнений, поэтому поиск и разработка новых подходов к лечению СД остается актуальной проблемой.

Целью настоящего исследования явилось изучение возможности коррекции углеводного обмена, а также метаболических и иммунологических нарушений с помощью алло- и изогенных гемопоэтической и стромальной фракции клеток костного мозга (ККМ) при использовании генетической модели СД 2 типа на разных стадиях этого заболевания.

Материалы и методы

Для коррекции клинических и морфологических признаков СД 2 типа использовали модель гомозиготных мутантных мышей линии C57BL/KsJYLepr^{db}/+ (db/db), эта модель имеет

стадийность течения заболевания и соответствующие патогенетические изменения внутренних органов.

В опытных группах использовали мышей в возрасте 1 мес. (первая стадия заболевания) и в возрасте 3-4 мес. (вторая стадия заболевания), а контрольную группу составили мыши с СД без введения ККМ.

Для коррекции клинических и патогенетических нарушений заболевания использовали аллогенные клетки (гемопоэтической и стромальной фракций) ККМ от здоровых доноров мышей линии B10.GFP и изогенные клетки (гемопоэтической и стромальной фракций) ККМ от фенотипически здоровых гетерозиготных мышей той же линии C57BL/KsJYLeprdb/+ (db/+). Введение ККМ проводили внутрибрюшинно, возраст доноров соответствовал возрасту реципиентов, сроки наблюдения составили 2 и 4 месяца.

I. В опытной группе на второй стадии заболевания, когда имели место выраженные клинические признаки, было выполнено 6 серий наблюдений:

серия 1. — однократно введено 4,5-5 млн. культивированных гемопоэтических аллогенных ККМ (ГПККМ);

серия 2. — однократно введено 4,5-5 млн. некультивированных аллогенных ККМ;

серия 3. — производилось 7-ми кратное введение ККМ: сначала 4-х кратно с интервалом в 7 дней введение культивированных аллогенных ГПККМ (общее количество 18-20 млн. клеток), а затем 3-х кратное с интервалом в 14 дней (общее количество 6-7,5 млн. клеток) культивированных мультипотентных мезенхимальных стромальных аллогенных ККМ (ММСК КМ);

серия 4. — 3-х кратное введение культивированных изогенных ГПККМ с интервалом 3-4 дня (общее количество 24-39 млн. клеток);

серия 5. — 3-х кратное введение с интервалом 14 дней культивированных изогенных ММСК КМ (общее количество 24-30 млн. клеток);

серия 6. — однократное введение 100 млн. культивированных изогенных ГПККМ.

II В опытной группе на первой стадии заболевания, характеризующейся начальными признаками СД, было выполнено 2 серии наблюдений:

— 7-ми кратное введение ККМ: сначала 4-х кратное введение аллогенных ГПККМ (общее количество 18-20 млн. клеток), затем 3-х кратное с интервалами 14 дней введение культивированных аллогенных ММСК КМ (общее количество 6,5-7 млн. клеток) (7-я серия) и однократное введение 100 млн. культивированных изогенных ГПККМ (8-я серия).

У мышей — реципиентов в динамике определяли в крови содержание глюкозы, гликозилированного гемоглобина (HbA1c), измеряли массу тела и массу внутренних органов; определяли объем выпитой воды и съеденного корма. Проводили в динамике гистологические исследования поджелудочной железы, печени, почек и селезенки.

Результаты и их обсуждение

После введения аллогенных ККМ у животных на 2-ой стадии СД (через 3-4 мес. после рождения) в серии 1 и 2 (где были введены одинаковые дозы клеток) наблюдали снижение показателей уровня глюкозы и HbA1c, более достоверный выраженный эффект был в серии 1 с использованием культивированных

клеток, а менее выраженный в серии 2 с некультивированными ККМ. Однако в серии 3 при многократном последовательном (7-ми кратном) применении аллогенных культивированных клеток удается достигнуть более пролонгированного воздействия на показатели углеводного обмена.

В 4 и 5 сериях после применения культивированных изогенных ККМ достоверно и в равной степени снижались показатели углеводного обмена по сравнению с контролем, однако эти показатели оставались выше, чем в 6-ой серии (с однократным введением в дозе 100 млн.). При введении такой дозы клеток удалось достигнуть более пролонгированного эффекта снижения показателей углеводного обмена (до 120 дней).

Считаем важным подчеркнуть, что аллогенные и изогенные ККМ во всех сериях при введении на 2-ой стадии СД не способствовали устойчивому снижению показателей углеводного обмена, они лишь стабилизировали его на уровне более низком по сравнению с контролем.

При введении ККМ 1стадии заболевания в сериях 7 и 8 удалось достигнуть выраженного пролонгированного снижения показателей углеводного обмена (120 дней) до субнормальных величин: 6,9±2,82 ммоль/л; 6,7±2,18 ммоль/л и 4,4±0,55%; 4,4±0,57% HbA1c соответственно.

Во всех сериях опытов масса тела, количество выпитой воды и аппетит животных стабилизировались и удерживались на одном уровне, но их выраженность была различной, так в серии 7 и 8 динамика этих показателей была близка к норме, а в контрольных группах с СД 2 типа за аналогичный период масса тела или повышалась, или понижалась в зависимости от стадии течения болезни. Наблюдали снижение полиурии до её полного исчезновения, особенно в сериях на ранней стадии развития болезни и в сериях (на выраженной стадии болезни) с использованием 7-ми кратного введения и при введении 100млн. ККМ; отмечено также устранение мацерации кожных покровов в опытных сериях после клеточной терапии, когда в контрольных группах мацерация становилась не заживающей раной, которая оставалась у животного вплоть до его гибели.

Полученные позитивные эффекты клеточной терапии в опытных сериях с СД привели к пролонгированному увеличению сроков жизни животных, так сроки жизни были в 1,7-2,3 раза (2-ой стадии заболевания) и 2,5-2,7 раза (на ранней стадии болезни) больше по сравнению с контролем.

В поджелудочной железе (ПЖ) при введении культивированной взвеси аллогенных и изогенных ККМ отмечается положительный эффект, выражающийся в увеличении количества и размеров островков Лангерганса (ОЛ), увеличении базофильных β-клеток островков, высоко достоверные результаты получены в сериях в 7, 8 и 3,6.

С целью подтверждения сохранения нейроэндокринных клеток в составе ОЛ в опытных сериях, использовался метод иммуногистохимического (ИГХ) анализа с хромогранином А. Полученные данные показали, что положительное цитоплазматическое окрашивание выявляется практически во всех клетках островков в сериях с использованием ККМ при разных дозах введений. С целью установления наличия и степени пролиферативной активности клеток островковой части ПЖ после введения ККМ, нами также было выполнено ИГХ исследование (иммуннопероксидазный метод с АТ) с

использованием маркеров репликации ДНК - антител к Ki-67. Использование данных ИГХ маркеров показало наличие высокой пролиферативной активности островковых клеток особенно в сериях 7, 8 и в сериях 3, 6, 1, 4, 5; несколько менее выраженную активность в серии 2. В контроле окраска островковых клеток на хромогранин А и антителами Ki-67 — отсутствовала.

В печени после клеточной терапии у реципиентов наблюдали накопление гликогена от умеренной степени до выраженной, за счет улучшения в печени белкового и углеводного обменов. В опытных сериях признаки жировой дистрофии гепатоцитов отсутствовали и отмечалось хорошее накопление гликогена гепатоцитами всех отделов долек, особенно в серии 7 и 8. В контроле — были выраженными признаки жировой дистрофии печени и сниженное содержание гликогена в гепатоцитах.

В ткани селезенки под действием алло- и изогенных ККМ формируются крупные лимфоидные фолликулы, наблюдается интенсивная бластотрансформация лимфоидных клеток в селезенке, что свидетельствует о восстановлении структуры селезенки как иммуно-компетентного органа и о восстановлении её иммунорегуляторной активности. Восстановление структуры селезенки подтверждают морфометрические исследования её белой пульпы, а также массы селезенок, которые были достоверно выше в сериях 7,8 и 3,6.

В почках во всех экспериментальных сериях после клеточной терапии наблюдали снижение степени выраженности дистрофических изменений эпителия дистальных и проксимальных канальцев; исчезновение эозинофильных и PAS- положительных масс в просвете канальцев, что было связано с нормализацией углеводного и жирового обменов в организме животных и более выраженные результаты получены в сериях 7 и 8.

В ходе экспериментальной работы была проведена оценка введенных аллогенных ККМ с геном зеленого белка, которая показала, что на 66 и 120 сутки после их введения, они не погибают в организме, а сохраняют свою жизнедеятельность, мигрируя в разные органы, в том числе в ПЖ и селезенку, стимулируя участие этих органов в ауторегенерации.

Выводы

Стволовые и прогениторные ККМ выполняют не заместительную, а биорегуляторную функцию.

Установлено, что выраженность терапевтического эффекта ККМ у мышей с СД 2 типа повышается: при использовании культивированных клеток; при повышении дозы и кратности введения ККМ, а также зависит от степени сохранности адаптационных резервов организма (т.е. от стадии заболевания), но не зависит от фенотипа используемых клеток (ГПККМ или ММСК КМ) и их гистосовместимости (аллогенные или изогенные клетки).

Введение ККМ на ранней стадии развития СД 2 типа (1 мес. после рождения) позволяет пролонгировано сохранять нормальные уровни глюкозы и гликозилированного гемоглобина в крови, сохранять значения массы тела в пределах нормальных величин, а так же предотвращать развитие патологических изменений во внутренних органах и поддерживать гипертрофию и гиперплазию ОЛ в ПЖ, что обеспечивает адекватную регуляцию углеводного обмена.

Введение ККМ на фоне выраженных проявлений СД 2 типа (3-4 мес. после рождения) не сопровождается значительным снижением гликемии и содержания гликозилированного гемоглобина, однако снижает выраженность развития патоморфологических изменений во внутренних органах, что способствует поддержанию их функции и пролонгирует сроки жизни животных.

Позитивные эффекты клеточной терапии у животных с СД 2 типа на клинические и морфологические проявления заболевания во внутренних органах, связаны с пролонгированными сроками сохранения жизнеспособности и функциональной активности ККМ в организме после трансплантации.

Dynamic indicators of correction by marrow cages a condition of C57BL/KsJYLepr^{db} / +

O.I.Stepanova, N.N.Karkishchenko, N.A.Onishchenko, O.V.Baranova

The received results are new, since the method of treatment CD 2 types with the help allogenic for the first time is applied and the isogene cultivated marrow cages the Method of treatment CD 2 types is executed for the first time on the domestic genetic model CD 2 types reproducing clinical displays CD of 2 types at the person. In work conditions at which effects of treatment by means of stem and progenitor marrow cages are optimized have been established. It is shown that the prolonged clinical effect of regulation of a carbohydrate exchange and prevention of deep structural pathogenetic infringements in an internal come at use of cages of a marrow in an early stage of development CD 2 types in high doses or repeated application of moderate doses of cages that allows is long to compensate a carbohydrate exchange at the expense of preservation of adequate functional activity islet the pancreas device. This work can be considered, how a preclinical stage of studying of possibility and perspectivity of application of cages of a marrow in complex treatment CD 2 types.

Key words: a diabetes 2 types, mice db/db, pancreas, carbohydrate exchange, marrow cages.