

Альтернативные модели клеточной трансплантологии при сахарном диабете 2 типа в различные сроки заболевания

О.И.Степанова, Н.Н.Каркищенко, Н.А.Онищенко*, О.В.Баранова

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область

** НФЦ трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И.Шумакова, Москва*

На гомозиготных мутантных мышах линии C57BL/KsYJLepr^{db}/₊ изучены возможности коррекции углеводного обмена, метаболических и иммунологических нарушений с помощью алло- и изогенных гемопоэтической и стромальной фракций клеток костного мозга. Опыт проводился на первой и второй стадиях заболевания. В результате экспериментов было доказано, что стволовые и прогениторные ККМ выполняют не заместительную, а биорегуляторную функцию.

Ключевые слова: сахарный диабет, мыши линии C57BL/KsYJLepr^{db}/₊, стволовые клетки.

Сахарный диабет (СД) II 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 нашего исследования было изучение возможности коррекции углеводного обмена, а также метаболических и иммунологических нарушений с помощью алло- и изогенных гемопоэтической и стромальной фракций клеток костного мозга (ККМ) при использовании генетической модели СД II типа на разных стадиях развития этого заболевания.

Материалы и методы

Для коррекции клинических и морфологических признаков СД II типа

использовали модель гомозиготных мутантных мышей линии C57BL/KsYJLepr^{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). Для коррекции клинических и патогенетических нарушений заболевания использовали аллогенные клетки (гемопоэтической и стромальной фракций) клеток костного мозга (ККМ) от доноров мышей линии B10.GFP и изогенные (аутологичные) клетки (гемопоэтической и стромальной фракций) ККМ от фенотипически здоровых гетерозиготных мышей той же линии C57BL/KsYJLepr^{db}/₊. Введение ККМ проводили внутрибрюшинно, возраст доноров соответствовал возрасту реципиентов, сроки наблюдений составили 2 и 4 месяца.

Опыт проводился на первой и второй стадиях заболевания. Всего было проведено 8 серий экспериментов.

I. В опытных сериях на второй стадии заболевания были введены аллогенные и изогенные ККМ:

серия 1 – 4,5-5 млн. культивированных (в течение 5 суток) гемопоэтических ККМ (ГПКМ) однократно;

серия 2 – 4,5-5 млн. некультивированных ККМ однократно;

серия 3 – семикратное введение ККМ по следующей схеме: сначала вводили 18-20 млн. ГПКМ (моноклеарную фракцию) культивированные в течение 5 суток четырехкратно с интервалом в 7 дней; затем – 6-7,5 млн. культивированных мультипотентных мезенхимальных стромальных (фибробластоподобных) ККМ (ММСК КМ) трехкратно (с интервалом в 14 дней);

серия 4 – 24-39 млн. культивированных (в течение 5 суток) ГПКМ трехкратно с интервалом 3-4 дня;

серия 5 – 24-30 млн. культивированных (в течение 14 суток) ММСК КМ трехкратно с интервалом 14 дней;

серия 6 – 100 млн. культивированных (в течение 5 суток) ГПКМ однократно.

II. В опытных сериях на первой стадии заболевания были введены аллогенные и изогенные ККМ:

серия 7 – семикратное введение ККМ по следующей схеме: сначала вводили 18-20 млн. аллогенные ГПКМ (моноклеарную фракцию) культивированные в течение 5 суток четырехкратно с интервалом в 7 дней, а затем 6-7,5 млн. культивированные (в течение 14 суток) ММСК КМ трехкратно с интервалом в 14 дней;

серия 8 – 100 млн. культивированных (в течение 5 суток) ГПКМ однократно.

У мышей-реципиентов в динамике определяли в крови содержание глюкозы, гликозилированного гемоглобина, измеряли массу тела и массу внутрен-

них органов; определяли объем выпитой воды и съеденного корма.

Результаты и их обсуждение

После введения аллогенных ККМ в одинаковых дозах (4,5-5 млн.) у животных (через 3-4 мес. после рождения) наблюдали снижение показателей уровня глюкозы и гликозилированного гемоглобина в крови, наиболее достоверно выраженный эффект был получен в серии с использованием культивированных клеток, а менее выраженный в серии с некультивированными ККМ. Однако, как показали наблюдения, при многократном последовательном (семикратном) применении аллогенных культивированных клеток удается достичь более пролонгированного воздействия на показатели углеводного обмена.

Применение культивированных изогенных ККМ показало следующие результаты. В группах с трехкратным введением ГПКМ в количестве 24-39 млн. и в группе с трехкратным введением ММСК КМ в количестве 24-30 млн. показатели углеводного обмена были достоверно равноценно ниже по сравнению с контролем, однако эти показатели были выше, чем в группе у животных с однократным введением в дозе 100 млн. ГПКМ. При введении такой дозы клеток удалось достичь более пролонгированного эффекта снижения показателей углеводного обмена. Однако аллогенные и изогенные ККМ во всех сериях опытов (на второй стадии болезни СД у животных) не способствовали устойчивому снижению показателей углеводного обмена, они лишь стабилизировали его на уровне более низком по сравнению с контролем.

При использовании культивированных аллогенных (при семикратном по-

следовательном введении ГПКМ и ММСК КМ) и изогенных (при однократном введении в дозе 100 млн. ГПКМ) КМ у животных на ранней стадии развития болезни СД, нам удалось достичь выраженного пролонгированного эффекта снижения показателей углеводного обмена до субнормальных величин.

Во всех опытных сериях масса тела и аппетит животных стабилизировались и удерживались на одном уровне (но их выраженность была различна), а в контрольных группах с СД II типа за аналогичный период масса тела или повышалась, или понижалась в зависимости от стадии течения болезни. Наблюдали снижение полиурии до ее полного исчезновения, особенно в сериях на ранней стадии развития болезни и в сериях (на второй стадии болезни) с использованием семикратного введения КМ и при введении 100 млн. КМ; отмечено также устранение мацерации кожных покровов в опытных сериях после клеточной терапии, тогда как в контрольной группе мацерация становилась обширной незаживающей раной, которая оставалась у животного вплоть до его гибели.

Полученные позитивные эффекты клеточной терапии в опытных сериях у животных на регуляцию углеводного обмена привели к пролонгированному сроку выживаемости, где сроки жизни были в 1,7-2,3 раза (на второй стадии заболевания СД II типа) и 2,5-2,7 раза (на ранней стадии болезни) больше по сравнению с контролем.

Результаты морфологических исследований

В поджелудочной железе (ПЖ) при введении культивированной взвеси аллогенных и изогенных КМ отмечает-

ся положительный эффект, выражающийся в увеличении количества и размеров островков Лангерганса (ОЛ), увеличении базофильных β -клеток островков, высоко достоверные результаты получены в сериях 8, 7 и 3, 6.

С целью подтверждения наличия нейроэндокринных клеток в составе ОЛ в опытных сериях использовали иммуногистохимический (ИГХ) анализ с хромогранином А. Полученные данные показали, что положительное цитоплазматическое окрашивание было выявлено практически во всех клетках островков групп с использованием КМ при разных дозах введения.

С целью установления наличия и степени пролиферативной активности клеток островковой части ПЖ после введения КМ, нами было выполнено ИГХ исследование (иммуннопероксидазный метод с АТ) с использованием маркеров репликации ДНК, антитела к Ki-67. Использование данных ИГХ маркеров показало наличие высокой пролиферативной активности в сериях 8, 7, 3, 6, 1, 4 и 5; несколько менее выраженную активность в подгруппе 2.

В печени после клеточной терапии у реципиентов наблюдали накопление гликогена от умеренной до выраженной степени содержания. Результат был достигнут за счет улучшения белкового и углеводного обменов в печени. В экспериментальных группах (серии 8, 7, 6, 3 и 4, 5) признаки жировой дистрофии гепатоцитов отсутствовали и наблюдалось хорошее накопление гликогена гепатоцитами всех отделов долек.

В ткани селезенки под действием алло- и изогенных КМ формируются крупные лимфоидные фолликулы, наблюдается интенсивная бластотрансформация лимфоидных клеток в

селезенке, что свидетельствует о восстановлении структуры селезенки, как иммуно-компетентного органа и восстановлении ее иммунорегуляторной активности, что подтвердило морфометрическое исследование и масса селезенки была значительно достоверно выше (в 2-6 раза) в сериях 8, 7, 6 и 3, и менее выражена в серии 2.

В почках во всех экспериментальных сериях после клеточной терапии наблюдали снижение степени выраженности дистрофических изменений эпителия дистальных и проксимальных канальцев, исчезновение эозинофильных масс в просвете канальцев, что было связано с нормализацией углеводного и жирового обменов.

В ходе экспериментальной работы была проведена оценка введенных аллогенных ККМ с геном зеленого белка, которая показала, что на 66 и 120 сутки по-

сле введения ККМ в организме они не погибают, а сохраняют свою жизнедеятельность, мигрируя в разные органы, в том числе в ПЖ и селезенку, стимулируя участие этих органов в ауторегенерации.

Выводы

В результате экспериментов было доказано, что стволовые и прогениторные ККМ выполняют не заместительную, а биорегуляторную функцию. В связи с этим более эффективным является применение ККМ на ранней стадии развития заболевания.

При введении ККМ на этапе выраженных клинических проявлений СД терапевтический эффект не столь резко выражен и степень его зависит от стадии деструктивных процессов в организме и сохранившегося уровня адаптационных резервов.

Alternative models of stem cells transplantation with a diabetes 2 types at various terms of disease

O.I.Stepanova, N.N.Karkischenko, N.A.Onishenko, O.V.Baranova

On homozygous mutant C57BL/KsYJLepr^{db}/₊ mice possibilities of correction of a carbohydrate exchange, metabolic and immunology infringements with allogeneic and isogena stem cells of hemopoetic and stromal fractions are studied. Experience was spent at the first and second stages of disease. As a result of experiments it has been proved that stem and progenitor stem cells carry out not replaceable, but biologically regulator function.

Key words: diabetes, C57BL/KsYJLepr^{db}/₊ mice, stem cells.