

## ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ РАЗВИТИЯ АЛЛОКСАНОВОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА У КРЫС В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Михайличенко В.Ю., Столяров С.С., Старых А.А.

*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.*

При аллоксановом диабете наблюдаются изменения в организме животных, характерные для сахарного диабета 1 типа. Трансплантация культур клеток поджелудочной железы кролика позволяет эффективно корректировать уровень гликемии при сахарном диабете у экспериментальных животных, а также приводит к эндокринной коррекции нарушений, вызванных аллоксановым диабетом. За счет повышения концентрации инсулина и С-пептида уменьшается уровень гликемии, снижается содержание контринсулярных гормонов, а также стабилизируются биохимические показатели крови (глюкоза, триглицериды, липопротеиды). При гистологическом исследовании через 1 месяц после начала эксперимента в поджелудочной железе животных при экспериментальном СД отмечалось резкое снижение числа островков Лангерганса, а сохранившиеся островки имели неправильную форму, небольшие размеры, состояли преимущественно из альфа-клеток. В поджелудочной железе через 14 дней после трансплантации наблюдается гипертрофия островков Лангерганса, их удельный объем составил  $0,3458 \pm 0,025$ , что 2,67 раза меньше, чем в норме, и в 5,77 раза больше, чем у животных без лечения. Однако размер островков был больше, чем в норме, на 1,88 раза (среднее число клеток в островке составило  $77,25 \pm 1,42$ ), что говорит о том, что уже к 14 дню после введения трансплантата вновь образованные островки достигают размеров, сравнимых с размерами нормальных островков.

Ключевые слова: аллоксановый диабет, гормоны, лечение.

## THE PATHOPHYSIOLOGICAL ASPECTS OF EXPERIMENTAL ALLOXAN DIABETES IN RATS

Mikhailichenko V. IU., Stoliarov S. S., Starykh A.A.

*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*

When alloxan diabetes we observed changes in animals are typical of type 1 diabetes. Transplantation of pancreatic endocrinocytes can effectively correct the rabbit blood glucose levels in diabetes in experimental animals and leads to correction of endocrine disorders caused by alloxan diabetes. Due to increasing of concentration of insulin and C-peptide we can see decreased blood glucose levels, reduced maintenance contrainsular hormones and stabilize biochemical parameters of blood (glucose, triglycerides, lipoproteins). Histologically at 1 month after start of the experiment in the pancreas of animals with experimental diabetes observed reduction in the number of islets of Langerhans. The transplantations of pancreas islet cell cultures of 3 monthly rabbits allows to normalize a level of glucose in the blood, to reach concentrations of insulin to 3,45 mkIU/ml, C-peptide to 0,83 ng/ml, corticosteron to 321nmol/l, thyroxin to 56 nmol/l and triiodothyroneto 2,64 nmol/l, that in accordance with normal. These islets had irregular shape, small size, composed mainly of alpha-cells. In the pancreas, in 14 days after transplantation is observed hypertrophy of islets of Langerhans. Their specific volume was  $0,3458 \pm 0,025$ , that of 2.67 times lower than the norm, and 5.77 times more than in the animals without treatment. But the size of the islets was greater than normal at 1.88 times (average number of cells in the islet was  $77,25 \pm 1,42$ ), which suggests that by day 14 after injection the transplant newly formed islets reach sizes, comparable to the size of normal islets.

Keywords: alloxan diabetes mellitus, hormone, treatment.

Несмотря на значительное развитие современной диабетологии, проблема профилактики, ранней диагностики, контроля за течением сахарного диабета (СД) у детей и взрослых стала острейшей медико-социальной проблемой, которая в большинстве стран

мира обозначена в числе приоритетных направлений развития здравоохранения. Приводя к тяжелым осложнениям и ранней потере трудоспособности, СД характеризуется высокой смертностью, в том числе в молодом возрасте [1]. Клеточная терапия позволяет в полном объеме обеспечить доставку в организм необходимых пептидов и факторов межклеточного взаимодействия, которые способствуют репаративной регенерации ткани поджелудочной железы, приводя таким образом к компенсации инсулиновой недостаточности [2,4]. Современные методы лечения СД не позволяют добиться нормального уровня глюкозы в крови без эпизодов гипо- и гипергликемии и полностью предотвратить развитие осложнений СД. Замещение  $\beta$ -клеток (пересадка поджелудочной железы или  $\beta$ -клеток) сопровождается осложнениями, требует пожизненной иммуносупрессивной терапии, при этом далеко не всегда достигается инсулинонезависимость, а также имеется существенный дефицит доноров. Одним из инновационных методов лечения является применение стволовых клеток (СК), которые лишены этих недостатков. Аллогенные трансплантации СК осложнены иммунным отторжением трансплантата, а использование эмбриональных СК – этическими аспектами, сложностью отбора клеточных линий и риском возникновения тератом [3]. На сегодняшний день одним из наиболее перспективных маркеров клеток-предшественниц эндокриноцитов поджелудочной железы является рецептор фактора стволовых клеток C-kit или CD117, который участвует в дифференцировке этих клеток в эндокриноциты в пренатальном развитии и сохраняется у взрослого человека в клетках островков поджелудочной железы. Однако до сих пор остаётся неизученным участие C-kit<sup>+</sup>-клеток-предшественниц в восстановлении популяции клеток островков Лангерганса при сахарном диабете I типа [5]. Новый взгляд на проблему регенерацию ткани ПЖ, которая до недавнего времени считалась органом, который абсолютно не восстанавливает эндокринную часть, и пути стимуляции репаративной регенерации открывают новые возможные пути лечения и профилактики развития СД.

**Цель** – исследовать патофизиологические изменения в организме крыс при аллоксановом диабете и эффективность их коррекции трансплантацией культуры клеток поджелудочной железы.

**Материал и методы.** Экспериментальное исследование выполнено на 60 крысах самцах массой 200–250 г. Животные были разделены на 3 группы по 20 крыс в каждой: 1 – контрольная группа; 2 – животные с аллоксановым диабетом; 3 – животные с аллоксановым диабетом, которым выполняли трансплантацию культур клеток поджелудочной железы кролика. Сахарный диабет вызывали путем подкожного введения раствора аллоксанатетрагидрата из расчета 20 мг на 100 г массы тела, предварительно 2 суток голодавшим животным. Раствор аллоксана готовили путем разведения кристаллического

субстрата AlloxanTetrahydrate фирмы Fluka-Sigma (Германия) в стерильной дистиллированной воде. После растворения кристаллов вещества, стерильность раствора осуществляли путем пропускания его через мембрану Millex-GV с фильтром 0,22  $\mu\text{m}$  фирмы MILLIPORE (Франция) и помещали в стерильные закатанные флаконы.

Материалом для приготовления культуры клеток поджелудочной железы служила поджелудочная железа (ПЖ) 3 месячного кролика породы Шиншилла. В стерильных условиях экспериментального операционного блока под внутримышечным наркозом Ketamine+Xylazine в пропорции 40+7,5 мг/кг выполняли верхнесрединную лапаротомию, мобилизовали поджелудочную железу кролика, пунктировали ее главный проток, в который вводили 0,25 % раствор трипсина. После чего ПЖ немедленно извлекали 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 АМН Украины. В лаборатории предварительно трипсинизированную поджелудочную железу механически делят на фрагменты размером 1мм<sup>3</sup> и подвергают тепловой трипсинизации при температуре 37<sup>0</sup>С – 5 минут в 0,25% растворе трипсина (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов, г. Москва). Действие трипсина останавливают добавлением 5 % сыворотки крупного рогатого скота «Биолот» (г.Санкт-Петербург). Полученную ферментативно-дезагрегированную клеточную суспензию центрифугируют при 800 об/мин, в течение 6 минут. Супернатант сливают, а в клеточный осадок добавляют питательную среду Игла (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов, г.Москва). Жизнеспособность клеток определяют в камере Горяева, предварительно окрашивая трипановым синим. Концентрация клеток в 1 мл суспензии составляет при этом 2,5 млн/мл. Трансплантацию культуры эндокринных клеток ПЖ производили крысам в переднюю брюшную стенку, толстой иглой в верхний квадрат живота из расчета 12000-15000 клеток на 1 крысу.

Содержание глюкозы, холестерина и триглицеридов определяли при помощи программируемого фотометра EppendorfEpac 6140, используя соответствующие наборы реактивов производства «Диакон ДС» (Россия), «Diasys» (Германия), «LaChema» (Чехия). Соотношение фракций липопротеидов определяли электрофотометрическим методом с применением системы для электрофореза «Helena» (Франция), в качестве носителя использовались пленки из ацетата целлюлозы. Концентрацию глюкозы определяли глюкозооксидазным методом. Содержание холестерина исследовали ферментативным методом с холестеролоксидазой и пероксидазой. Определение концентрации триглицеридов проводилось ферментативным методом с глицерокиназой и глицерол-3-фосфатоксидазой.

Определение содержания инсулина, кортикостерона, С-пептида, тироксина и трийодтиронина проводили радиоиммунологическим методом с использованием

стандартных коммерческих наборов реактивов фирмы “Immunotech” (Чехия). Уровень инсулина и С-пептида определяли через 4-6 часов после трансплантации клеток, а также через 1,7 суток, 1 и 3 месяц.

В опыт брали животных со средней тяжестью сахарного диабета (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).

Гистологическое исследование органов (ПЖ, сердца, почек, сосудов) проводили на 6, 10, 14 и 30 сутки после трансплантации эндокриноцитов ПЖ. Органы фиксировались в 10 % нейтральном формалине и затем заливались парафином. Гистологические срезы окрашивались гематоксилином и эозином, по Вергоффу, альциановым синим при рН 1,0 и 2,6, выполняли ШИК-реакцию.

Исследование окрашенных препаратов и морфометрическое исследование проводили с помощью исследовательского микроскопа OlympusAX70 (Япония) и соединенной с ним компьютерной системы с программой анализа изображения AnalySIS 3.1 (Германия).

Статистическую обработку полученных данных выполняли на компьютере PentiumIII с помощью программ «MicrosoftExcel 10.0», «Statistica 6.0» (USA).

**Результаты исследований.** После введения диабетогенной дозы аллоксанатетрагидрата наблюдалось несколько фаз изменений содержания глюкозы 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 (свыше 24 часов).

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

Известно, что инсулиновая недостаточность при аллоксановом диабете приводит к усиленному распаду тканевых белков, повышенному поступлению в кровь аминокислот, увеличению общего азота крови. Характерным нарушением липидного обмена является повышение содержания в сыворотке липопротеидов низкой плотности (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 липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) с 38,1 % (норма) до 12,8 %. Снижение уровня глюкозы отмечали через 4–6 часов после трансплантации, которое сопровождалось повышением уровня инсулина крови до 12,3 мкМЕ/мл и уровня С-

пептида до 0,5 нг\мл. В дальнейшем, через 1 сутки уровень инсулина повышался до 12,7 мкМЕ\мл, а С-пептид – до 1,48 нг\мл. Одновременно наблюдалось снижение уровня кортикостерона с 609 до 456 нмоль\л, повышение содержания общего трийодтиронина с 1,08 до 2,15 нмоль\л, общего тироксина с 20,1 до 36,4 нмоль\л. В биохимических анализах отмечалось снижение уровня глюкозы до 4,12 ммоль\л. Также снижалась концентрация триглицеридов до 0,48 ммоль\л и повышалось содержание ЛПВП до 34,3 %, хотя уровень ЛПНП оставался практически неизменен.

Отмечался достоверный эндокринокорректирующий эффект после трансплантации культур клеток ПЖ (табл.1), который проявлялся в нормализации концентрации в крови инсулина, С-пептида, кортикостерона, тироксина и трийодтиронина.

При гистологическом исследовании через 1 месяц после начала эксперимента в поджелудочной железе животных при экспериментальном СД отмечалось резкое снижение числа островков Лангерганса, а сохранившиеся островки имели неправильную форму, небольшие размеры, состояли преимущественно из альфа-клеток. В сердце определяется выраженная гипертрофия миокарда, очаговые дистрофические изменения кардиомиоцитов, стенка сосудов утолщена, разволокнена, просвет их расширен, вокруг сосудов отмечаются очаги плазморрагии. В почках определяются тонкие нежные прослойки соединительной ткани между петлями извитых канальцев, в которых наблюдаются дистрофические изменения. В сосудах наблюдаются такие же изменения, как и в сосудах сердца.

**Таблица 1**

Динамика биохимических показателей крови крыс в разные сроки опыта (M±m)

| Показатели            | Норма     | 1 месяц аллоксанового диабета | 1-е сутки после трансплантации | 7-е сутки после трансплантации | 1 месяц после трансплантации | 3 месяца после трансплантации |
|-----------------------|-----------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| Глюкоза ммоль\л       | 4,31±0,13 | 13,79±0,25                    | 4,12±0,26                      | 3,89±0,18                      | 3,92±0,11                    | 4,19±0,1                      |
| Инсулин мкМЕ\л        | 3,53±0,21 | 1,9±0,1                       | 12,7±0,7                       | 3,7±0,07                       | 3,45±0,08                    | 3,01±0,03                     |
| С-пептид нг\мл        | 0,73±0,02 | 0,15±0,01                     | 1,48±0,03                      | 1,59±0,08                      | 0,83±0,12                    | 1,06±0,03                     |
| Кортикостерон нмоль\л | 354±24    | 609±21                        | 456±6                          | 414±15                         | 321±9                        | 357±18                        |
| Тироксин нмоль\л      | 39,5±1,9  | 20,1±0,8                      | 36,4±0,6                       | 63±1,5                         | 56±0,7                       | 51±1                          |
| Трийодтиронин нмо     | 2,42±0,15 | 1,08±0,09                     | 2,15±0,06                      | 2,44±0,14                      | 2,64±0,06                    | 1,88±0,03                     |

|      |  |  |  |  |  |  |
|------|--|--|--|--|--|--|
| ль\л |  |  |  |  |  |  |
|------|--|--|--|--|--|--|

**Таблица 2**

Среднее количество клеток в островках Лангерганса и их удельный объем

|               | Животные без<br>лечения | Пересадка<br>культуры клеток<br>ПЖЖ | Животные без<br>лечения | Пересадка<br>культуры клеток<br>ПЖЖ |
|---------------|-------------------------|-------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------|
| 6-й день      | 5,68±0,14               | 20,18±3,78*                         | 0,0634±0,0051           | 0,1287±0,0078*                      |
| 10-й день     | 5,74±0,12               | 41,21±2,44*                         | 0,0652±0,0061           | 0,1835±0,0102*                      |
| 14-й день     | 5,54±0,21               | 77,25±1,42*                         | 0,0599±0,0034           | 0,3458±0,0122*                      |
| 30-й день     | 5,55±0,15               | 85,25±1,12*                         | 0,0541±0,0075           | 0,3745±0,0145*                      |
| 3 месяца      | 5,12±0,22               | 84,14±1,19*                         | 0,0557±0,0054           | 0,3798±0,0123*                      |
| 6 месяцев     | 5,01±0,24               | 84,79±1,04*                         | 0,0412±0,0102           | 0,3576±0,0178*                      |
| 12<br>месяцев | -**                     | 83,97±1,45                          | -**                     | 0,3443±0,0158                       |

Примечания: среднее количество клеток в островках в контрольной группе составило 41,01±0,24, перед лечением у диабетических животных –5,67±0,13;

\* – разница между изучаемым и предыдущим показателем достоверна (p<0,05);

\*\* – ни одно животное без лечения не прожило более 9 месяцев.

Через неделю после трансплантации культуры клеток ПЖ в поджелудочной железе экспериментальных животных наблюдали регенерацию островков Лангерганса возле протоков поджелудочной железы (табл. 2). В составе островковой ткани определялись все типы клеток. По данным литературы источником регенерации эндокринных клеток являются клетки стенки мелких протоков поджелудочной железы, которые начинают пролиферировать под воздействием факторов роста, выделяемых клетками пересаженной культуры, и дифференцироваться в эндокринные клетки. Количество вновь образованных островков было меньше по сравнению с нормой. В поджелудочной железе через 14 дней после трансплантации наблюдается гипертрофия островков Лангерганса, их удельный объем составил 0,3458±0,025, что в 2,67 раза меньше, чем в норме, и в 5,77 раза больше, чем у животных без лечения. Однако размер островков был больше, чем в норме, на 1,88 раза (среднее число клеток в островке составило 77,25±1,42), что говорит о том, что уже к 14 дню после введения трансплантата вновь образованные островки достигают размеров, сравнимых с размерами нормальных островков.

### **Заключение**

При аллоксановом диабете наблюдаются изменения в организме животных, характерные для сахарного диабета 1 типа. Трансплантация культур эндокриноцитов поджелудочной железы кролика позволяет эффективно корректировать уровень гликемии при сахарном диабете у экспериментальных животных, а также приводит к эндокринной коррекции нарушений, вызванных аллоксановым диабетом. За счет повышения концентрации инсулина и С-пептида уменьшается уровень гликемии, снижается содержание контринсулярных гормонов, а также стабилизируются биохимические показатели крови (глюкоза, триглицериды, липопротеиды). При гистологическом исследовании отмечалась пролиферация и регенерация сохранившихся островков Лангерганса через 2 недели после введения культуры клеток поджелудочной железы. Таким образом, продемонстрировано влияние аллоксанового диабета на углеводный, белковый и жировой виды обмена и возможность их коррекции стимуляцией регенерации собственной эндокринной части поджелудочной железы путем трансплантации ксеногенной культуры клеток.

### Список литературы

1. Гончарова О.В. Значение «школ сахарного диабета» в профилактике сахарного диабета и его осложнений у детей и взрослых / О.В. Гончарова, Н.В. Зиминая, Р.И. Девишев // Русский медицинский журнал. – 2012. – № 20. – С.1001-1007.
2. Дедов И.И. Современные возможности применения стволовых клеток при сахарном диабете / И.И. Дедов, И.А. Лисуков, Д.Н. Лаптев // Сахарный диабет. – 2014. – № 2. – С.20-28.
3. Закирьянов А.Р. Возможные пути реализации регенерационной стратегии при лечении сахарного диабета 1 типа методами клеточной трансплантации / А.Р. Закирьянов, Н.А. Онищенко // Гены и клетки. – 2007. – № 2. – С.23-33.
4. Трансплантация культуры клеток поджелудочной железы при аллоксановом диабете (сообщение 1) / О.И. Миминошвили, В.Ю. Михайличенко, А.Г. Попандопуло и др. // Вестник неотложной и восстановительной медицины. – 2003. – Т.4. – № 3. – С.530-533.
5. С-kit-позитивные клетки островков поджелудочной железы крысы как клетки-предшественницы эндокриноцитов при аллоксановом диабете / А.С. Плюшкина, М.С. Калигин, Д.И. Андреева и др. // Гены и клетки. – 2012. – № 3. – С.138-141.

### Рецензенты:

Кубышкин А.В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой общей и клинической патофизиологии Медицинской академии имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный

университет имени В. И. Вернадского» Министерства образования и науки Российской Федерации, г. Симферополь;

Ильченко Ф.Н., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой хирургии № 2 Медицинской академии имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского» Министерства образования и науки Российской Федерации, г. Симферополь.