

Морфофункциональное состояние тканевых базофилов при экспериментальном аллоксановом диабете на фоне ксенотрансплантации островковых клеток

Чубик М.П., Красноженов Е.П., Загребин Л.В., Дамбаев Г.Ц., Чубик М.В.

Morphofunctional state of tissue basophiles at experimental alloxanic diabetes on the background of insular cell xenotransplantation

Chubik M.P., Krasnozhenov Ye.P., Zagrebin L.V., Dambayev G.Ts., Chubik M.V.

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Чубик М.П., Красноженов Е.П., Загребин Л.В. и др.

Изучены морфофункциональные показатели тканевых базофилов у крыс при экспериментальном аллоксановом диабете на фоне ксенотрансплантации островковых клеток поджелудочной железы. Определены достоверные изменения количественного содержания, функциональной и секреторной активности тканевых базофилов после пересадки островковых клеток. В ранние сроки после имплантации островковой части ксеногенной поджелудочной железы отмечено выраженное повышение функциональной и секреторной активности, увеличение количества молодых форм клеток по сравнению со зрелыми.

Ключевые слова: тканевые базофилы, аллоксановый диабет, имплантация.

Morphofunctional indices of tissue basophiles in rats at experimental alloxanic diabetes on the background of pancreas insular cell xenotransplantation have been studied. The reliable changes of quantitative content, functional and secretory activity of tissue basophiles after insular cell transplantation have been defined. In the early time after transplantation of xenogeneic insular pancreas part it has been marked an expressed increase of functional and secretory activity, increase of the number of young cell forms as compared to the mature ones.

Key words: tissue basophiles, alloxanic diabetes, implantation.

УДК 616.155.36:616.631.11

Введение

В настоящее время все большее распространение получают трансплантационные методы лечения сахарного диабета [5]. Активно совершенствуются методы компенсации диабета 1 и 2 типов посредством трансплантации островковой части аллогенной и ксеногенной поджелудочной железы [6]. К сожалению, еще не до конца разработаны показания к выполнению имплантации островковых клеток и критерии оценки клинической эффективности. Нуждаются в уточнении и вопросы, касающиеся сроков повторной трансплантации [1]. В связи с этим всестороннее исследование реализации механизмов трансплантационной терапии сахарного диабета представляет значительный интерес. Целью настоящей работы явилось исследование морфологических характеристик и функционального состояния тканевых

базофилов при ксенотрансплантации островковых клеток.

Материал и методы

В данной работе в качестве параметра, характеризующего влияние имплантированных островковых клеток на патологический процесс, использовался морфофункциональный статус тканевых базофилов (ТБ) (тучных клеток), которые рассматриваются как своеобразный индикатор напряженности органа или ткани, чутко реагирующий на изменение внутренней среды организма [3]. В рамках работы была исследована комплексная морфофункциональная характеристика ТБ до и после ксеногенной трансплантации культур островковых клеток крысам с экспериментальным аллоксановым диабетом.

Эксперименты выполнялись на 60 взрослых беспородных крысах-самцах массой 180–220 г, разделенных на три группы: 5 животных составляли контрольную группу, 25 – группу с аллоксановым диабетом (концентрация глюкозы в крови не ниже 14 ммоль/л), 30 – группу животных с экспериментальным диабетом с имплантированной пластиной из пористого никелида титана с культивированными на ней островковыми клетками. Для моделирования аллоксанового диабета у животных использовали 4%-й раствор аллоксангидрата («Лахема-Хеманол», Чехия), который вводили подкожно однократно в дозе 400 мг/кг [4]. Аллоксан вызывал тяжелую форму сахарного диабета, о чем свидетельствовали выраженная гипергликемия, снижение массы тела и высокая летальность. Культивированную на подложке из пористого никелида титана островковую часть поджелудочной железы свиньи имплантировали в мышцы живота крыс, которых предварительно усыпляли эфиром. Имплантацию на носителе из пористого никелида титана проводили спустя 7 сут после введения 4%-го раствора аллоксангидрата крысам с подтвержденной гипергликемией. Исследования проводились на 7, 15, 30, 45, 60 и 90-е сут после имплантации, параллельно изучалась группа крыс с аллоксановым диабетом без имплантата.

Исследуемым материалом являлись гистопрепараты кожи, пленочные препараты брыжейки, перитонеальная жидкость, периферическая кровь. Из спины животного с правой стороны вырезали кусочек кожи, фиксировали в жидкости Карнуа и готовили парафиновые срезы, которые окрашивали толуидиновым синим. Используя светловую микроскопию (ув. 400), подсчитывали общее количество ТБ, содержание молодых, зрелых и дегранулированных клеток и определяли индекс активности (соотношение дегранулированных и недегранулированных базофилов) и индекс созревания (отношение количества молодых к числу зрелых форм).

Для изучения мезентериальных базофилов из брыжейки мыши готовили пленочные препараты, фиксировали метиловым спиртом и окрашивали 0,1%-м раствором толуидинового синего. Под микроскопом (ув. 400) подсчитывали общее число тучных клеток в 30 полях зрения с учетом дегранулированных и зрелых форм.

Для получения перитонеальной жидкости животным внутрибрюшинно вводили 1 мл подогретого до 37 °С раствора Хенкса. Через 60–90 с животных забивали и делали небольшой разрез передней брюшной стенки. Крысу осторож-

но переворачивали животом вниз, так, чтобы из отверстия свисала петля кишечника. Перитонеальная жидкость по стенке кишки стекала в пробирку, смоченную гепарином. В пробирку добавляли одну каплю нейтрального красного, а затем с помощью камеры Фукса–Розенталя под микроскопом (ув. 400) подсчитывали процентное содержание ТБ, а также индексы созревания и активности [2].

Исследовалась реакция дегрануляции ТБ на активатор секреции – пирогенал (липосахарид *S. typhi*), учитывался процент дегранулирующих базофилов и интенсивность их дегрануляции. Определялся процент дегрануляции тканевых базофилов как соотношение числа дегранулированных клеток к числу всех интактных ТБ.

Концентрацию глюкозы в крови определяли **глюкозооксидазным методом**. Распределение концентрации глюкозы в крови в исследованной выборке не отличалось от нормального.

Для оценки достоверности различий данных использовали *t*-критерий Стьюдента. Критический уровень значимости (*p*) задавался величиной 0,05. Результаты исследования представлены как $X \pm m$, где *X* – среднее значение; *m* – ошибка среднего.

Результаты и обсуждение

Данные проведенного исследования продемонстрировали реакцию ТБ на диабетическое состояние организма изменением количественного содержания, морфологических и функциональных признаков. Так, ТБ кожи крыс реагировали на экспериментальный аллоксановый диабет уменьшением численности в среднем на 40–60% (рис. 1) и незначительным повышением функциональной активности. Изучение морфофункционального статуса ТБ брыжейки у крыс при введении аллоксана показало, что количественное содержание ТБ достоверно уменьшалось в течение всего эксперимента на 35–70%. Показатель функциональной активности мезентериальных ТБ в группе животных с экспериментальным диабетом превышал контрольные данные на 5–10% в течение всего опыта.

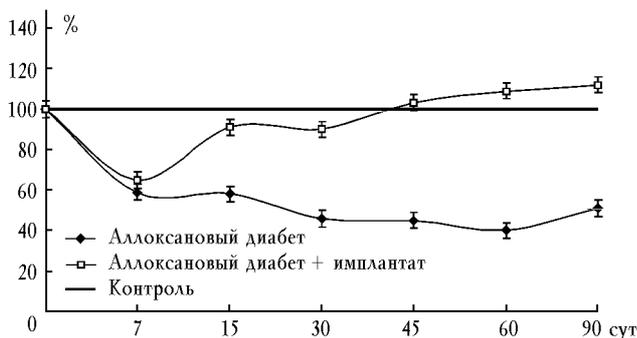


Рис. 1. Динамика количественного содержания тканевых базофилов кожи крыс

Содержание тучных клеток в перитонеальной жидкости крыс достоверно снижалось относительно нормы в среднем на 45%. У диабетических животных наблюдалось снижение секреторной активности (процент дегрануляции тканевых базофилов) по сравнению с интактными крысами в среднем на 10% (рис. 2). Значения индекса созревания ТБ кожи у крыс с аллоксановым диабетом были существенно снижены относительно нормального уровня (на 35–50%) в течение всего опыта (рис. 3). Аналогичная динамика соотношения молодых и зрелых форм тучных клеток отмечалась при изучении брыжейки и перитонеальной жидкости.

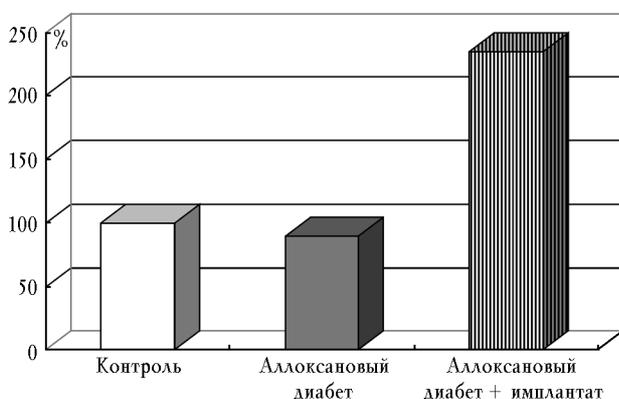


Рис. 2. Процент дегрануляции тканевых базофилов перитонеальной жидкости диабетических крыс спустя 30 сут после имплантации островковых клеток

Необходимо отметить, что уже через 7 сут после введения аллоксана у животных развивался отчетливо выраженный сахарный диабет. Уровень гликемии натощак в эти сроки составлял 207% от контрольных показателей.

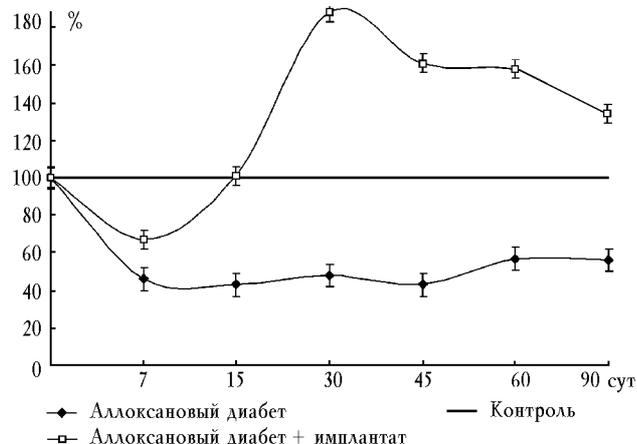


Рис. 3. Динамика индекса созревания мезентериальных тканевых базофилов крыс

Изучение морфофункционального статуса ТБ лабораторных крыс при аллоксановом диабете на фоне имплантации островковых клеток показало, что в ранние сроки после проведенной пересадки (7–30 сут) количество ТБ было снижено по сравнению с контролем (см. рис. 1). К 30-м сут после имплантации показатели функциональной и секреторной активности ТБ возрастали до 160–230% (см. рис. 2). Спустя 1 мес после имплантации численность ТБ росла, приближаясь к нормальным значениям (см. рис. 1), степень дегрануляции при этом не изменялась. Показатели секреторной напряженности либо не изменялись, либо несколько понижались. Отмечалось возрастание количества молодых тучных клеток на 60–100% по сравнению с контролем (см. рис. 3). К 2 мес после имплантации активность ТБ падала, все показатели, кроме индекса созревания, приближались к норме. В эти сроки отмечалось снижение уровня глюкозы в крови животных от $(14,4 \pm 0,7)$ ммоль/л (1 мес после имплантации) до $(11,2 \pm 1,4)$ ммоль/л. Через 90 сут после имплантации все показатели морфофункционального состояния ТБ стабилизировались, индекс созревания оставался несколько повышенным (на 10–40%) по сравнению с интактными животными (см. рис. 3).

Заключение

Таким образом, для аллоксанового диабета характерно угнетение популяции ТБ при невысоком уровне дегрануляции медиаторов в ранние сроки после моделирования заболевания. В первые недели после трансплантации островковой части ксеногенной поджелудочной железы наблюдалось выраженное повышение функциональной и секреторной активности и, как следствие этого, снижение количества кле-

Чубик М.П., Красноженов Е.П., Загребин Л.В. и др.

ток. Затем численность тучных клеток начинала расти, увеличивалось количество молодых форм клеток по сравнению со зрелыми. При этом функциональная напряженность оставалась высокой. Тучноклеточная реакция достигала пика на 5–6 нед после имплантации, все морфофункциональные параметры, кроме численности клеток, значительно превышали контрольные показатели. Понижение количества ТБ связано с длительной и интенсивной дегрануляцией. Достигнув пика, активность тучных клеток постепенно снижалась, приближаясь к норме, при этом индекс созревания оставался несколько повышенным в течение 3 мес после имплантации островковых клеток, что говорит о компенсаторном генезе ТБ.

Литература

Морфофункциональное состояние тканевых базофилов...

1. Ахметов А.С. Стратегии в области сахарного диабета: начало новой эры // Рус. мед. журн. 1998. Т. 6. № 12. С. 11–13.
2. Зеличенко Л.И. Тучные клетки крыс в аллергических реакциях немедленного типа: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 1969.
3. Проценко В.А., Шпак С.И., Лопенко С.И. Тканевые базофилы и базофильные гранулоциты крови. М.: Медицина, 1987.
4. Сапрыкина Э.В., Козлов Ю.В., Соснина Н.В., Байков А.Н., Новицкий В.В. Исследование синтеза фосфолипидов в печени мышей с аллоксановым диабетом // Вопр. мед. химии. 1999. № 6. С. 27–30.
5. Шумаков В.И., Скалецкий Н.Н. Трансплантация островковых клеток в лечении сахарного диабета // Бюл. эксперим. биол. 1998. Т. 126. Прил. 1. С. 109–114.
6. Shapiro A.M.J., Lakey J.R.T., Ryan E.A. Islet transplantation in seven patients with type I diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen // N. Engl. J. Med. 2001. V. 29. № 1. P. 47–53.

Поступила в редакцию 13.01.2004 г.