

УДК: 615.361.38.013.014.413:616.379-008.64

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ КСЕНОТРАНСПЛАНТАЦІЇ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ КУЛЬТУР МІКРОФРАГМЕНТІВ ОСТРІВЦЕВОЇ ТКАНИНИ ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ ПРИ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТІ

О.М. Побеленський

Дорожня клінічна лікарня станції Харків Південної залізниці

РЕЗЮМЕ

У роботі було проведено експериментальне дослідження впливу трансплантації під капсулу нирки кріоконсервованих мікрофрагментів підшлункової залози новонароджених поросят на рівень глікемії та показники перекисного окислення ліпідів у щурів з алоксановим діабетом.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: цукровий діабет, перекисне окислення ліпідів, мікрофрагменти підшлункової залози, глікемія

Постановка проблеми у загальному вигляді. Лікування цукрового діабету і його ускладнень залишається однією з найбільш актуальних проблем сучасної медицини. Доцільність застосування методу трансплантації острівцевої тканини підшлункової залози (ОТПЗ) вже має експериментальні і клінічні підтвердження в Україні і за кордоном. Для успішної трансплантації може бути використаний матеріал підшлункової залози (ізолювані β -клітини, острівці, мікрофрагменти тканини) плодів людини і тварин або новонароджених тварин – свиней, кроликів, великої рогатої худоби [4, 6, 7, 8]. При цьому важливі функціональна повноцінність матеріалу, що трансплантується, і створення умов для достатньо тривалого функціонування його в організмі реципієнта, а також наявність запасів матеріалу для клінічних цілей.

Зв'язок проблеми із важливими науковими та практичними завданнями. Робота виконана в межах комплексної науково-дослідної роботи кафедри хірургічних хвороб Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна "Експериментальний цукровий діабет і його хірургічна корекція".

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Істотним є обґрунтований вибір місця введення трансплантаційного матеріалу в організм реципієнта, техніка проведення операції [9]. Для оптимізації умов підготовки тканинного матеріалу до трансплантації, пом'якшення можливого імунного конфлікту після операції використовуються різні підходи, серед яких культивування і кокультивування β -клітин з іншими видами клітин, обробка антиоксидантами, інкапсуляція, кріоконсервування і т.д. [5].

Визначення невіршених раніше частин загальної проблеми. Нами не знайдено робіт, присвячених дослідженню перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) у щурів з алоксановим

діабетом. При цьому найпереконливішими є дані ефективності операції *in vivo*.

Метою даного дослідження було вивчення впливу імплантації під капсулу нирки кріоконсервованих мікрофрагментів підшлункової залози (МФПЗ) новонароджених поросят на рівень глікемії і показники ПОЛ у щурів з алоксановим діабетом.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

У роботі було використано 60 статевозрілих щурів-самців лінії Вістар масою 180-210 г, з них 10 тварин були контрольними. Алоксан-моногідрат (ICN Biomedical Inc.) вводили під шкіру одноразово в дозі 130 мг/кг маси тварини після попереднього 24-годинного голодування при вільному доступі до води [14]. Рівень летальності склав 45%. Щури (36 тварин), у яких на 7-у добу розвинулася стійка гіперглікемія (не менш 12 ммоль/л), були розділені на дві групи. Перша група лікування не отримувала. Тваринам другої групи на 7-му добу під капсулу нирки були одноразово імплантовані МФПЗ новонароджених поросят в дозі 0,5 г на тварину (інсулін-продукція дози – не менш 600 мкЕ/добу). Технологія виготовлення препарату МФПЗ новонароджених поросят для імплантації [5] включає, серед інших, етапи культивування нативної тканини та кріоконсервування, які сприяють зменшенню антигенності тканини.

Ступінь глікемії і інтенсивності ПОЛ в сироватці крові та печінці визначали на 7, 15 і 30 добу після початку введення препаратів. Кров брали з хвостової вени, а декапітували тварин під легким ефірним наркозом. Рівень глюкози визначали натще в сироватці крові хромооксигеназним методом.

Рівень ПОЛ визначали за початковим рівнем продуктів, що реагують з тіобарбітуровою кислотою (ТБКАП) в сироватці крові, за початковим, спонтанним, $5 \cdot 10^{-3}$ М Fe^{2+} - і аскорбатіндукованим рівнем ТБКАП в гомоге-

наті печінки спектрофотометричним методом (на спектрофотометрі СФ-46) [1]. Інтенсивність вільнорадикального окислення ліпідів сироватки крові і гомогената печінки визначали також за величиною хемілюмінесценції (ХЛ) з допомогою хемілюмінометра, в режимі рахування фотонів. До ячейки хемілюмінометра, що містила 1 мл фізіологічного розчину і 100 мкл сироватки крові або гомогенату печінки, додавали 100 мкл розчину двовалентного заліза в кінцевій концентрації $5 \cdot 10^{-2}$ М. Реєстрували інтенсивність світіння (світлосуму) протягом 1 хв, результат виражали в умовних одиницях і у вигляді нормованих значень, а саме як відношення експериментального значення до контрольного [1].

Для визначення стійкості тканини до перекисного окислення в ячейку хемілюмінометра, крім 1 мл фізіологічного розчину, 100 мкл гомогената тканини, додавали 100 мкл 5% розчину перекису водню і протягом 1 хв реєстрували інтенсивність світіння, яку визначали в умовних одиницях.

У роботі використовувались реактиви марки ХЧ і ЧДА. Статистичну обробку отриманих результатів проводили за методом Стьюдента-Фішера.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Протягом місяця після введення кріоконсервованої ОТПЗ тваринам з алоксановим діабетом відзначили низьку смертність (близько 5%) у групі оперованих тварин у порівнянні з групою неоперованих щурів (30%).

У тварин з ЦД, які не отримували препарату МФПЗ, рівень глюкози в сироватці крові натще на 7-у добу перевищував норму в 2,2 рази, а на 15-у добу в 3,6 рази. На 30-у добу спостереження рівень глюкози в крові дещо зменшувався, але залишався значно вищим норми (табл.1). У тварин, яким були

введені МФПЗ, цей показник залишався незмінним до 15-ї доби і зменшувався на 30-у.

Як відомо, підвищений рівень глюкози в крові при ЦД пов'язаний, в першу чергу, з порушенням надходження глюкози в клітини, а це призводить до збою звичайних механізмів енергозабезпечення. При цьому в метаболізм більш активно включаються жирні кислоти. Недоокислені ненасичені жирні кислоти можуть бути джерелом вільних радикалів, які призводять до розвитку ланцюгової реакції ПОЛ, а іони Fe^{2+} , які знаходяться в клітині, викликають розгалуження цих ланцюгів [3]. У результаті ЦД супроводжується активацією перекисних процесів і накопиченням в тканинах і крові ТБКАП.

У випадку, коли ЦД не лікувався, максимальна концентрація ТБКАП в сироватці крові спостерігалась на 15-у добу експерименту з деяким зниженням на 30-у (табл. 1). Максимум концентрації на 15-у добу відмічено і при лікуванні тварин з допомогою МФПЗ, але при цьому концентрація ТБКАП на 30-у добу достовірно менша, ніж у тварин, що не отримували лікування. Тут слід зауважити, що підвищений вміст ТБКАП і динаміка його змін у сироватці крові щурів з алоксановим діабетом, незалежно від введення МФПЗ, можуть пояснюватися особливостями самої експериментальної моделі. Припускається, що механізм дії алоксана пов'язаний з порушенням мембранного апарату клітин через активацію вільнорадикальних процесів. Відомо, що алоксан не має строгої специфічності до β -клітин інсулярного апарату. Токсичні зміни, що не пов'язані з порушеннями в панкреатичних β -клітинах і розвитком діабету, спостерігаються і в інших органах. Можливо, через місяць після введення алоксана починає також проявлятися дія деяких компенсаторних механізмів організму антиоксидантної спрямованості.

Таблиця 1

Рівень глюкози та концентрація ТБКАП в сироватці крові щурів з ЦД

Показник	Умови експерименту	Термін спостереження, доби		
		7	15	30
Рівень глюкози (в % від контролю)	ЦД	223	360	290
	ЦД+МФПЗ	218	215	160
Концентрація ТБКАП (нмоль/мл)	Контроль	$3,1 \pm 0,2$	$3,2 \pm 0,3$	$3,4 \pm 0,2$
	ЦД	$5,6 \pm 0,4$	$7,8 \pm 0,5$	$6,1 \pm 0,4$
	ЦД+МФПЗ	$5,4 \pm 0,4$	$7,0 \pm 0,5$	$4,4 \pm 0,2^2$

Примітки: 1 – відмінності статистично недостовірні в порівнянні з контролем, $p > 0,05$;
2 – відмінності статистично достовірні в порівнянні з ЦД, $p < 0,05$.

Якщо рівень ТБКАП дає інформацію про кількість кінцевих продуктів ПОЛ, то інтенсивність ХЛ, індукованої Fe^{2+} , пропорційна кількості вільних радикалів в біологічному об'єкті і, таким чином, дає інформацію про початковий етап активації процесів ПОЛ. ХЛ, індукована H_2O_2 , дозволяє оцінити стій-

кість біологічного об'єкту до перекисного окислення, яка залежить від багатьох факторів, але в першу чергу від потужності антиоксидантних систем, що знешкоджують перекиси [1].

Як видно з табл. 2, показники ХЛ сироватки крові, як індукованої Fe^{2+} , так і H_2O_2 ,

змінюються в значно більшій мірі, ніж рівень ТБКАП, і у щурів з ЦД на 15-30-у добу перевищують контрольні значення більше ніж в 3-4 рази. На 15-у добу обидва показни-

ки при всіх способах лікування нижчі, ніж у тварин, що не отримували лікування, але до норми повертається тільки один показник.

Таблиця 2

Інтенсивність хемілюмінесценції (умовн.од.) сироватки крові щурів

Умови експерименту	Індуктор ХЛ	Термін спостереження, доби		
		7	15	30
Контроль	Fe ²⁺	118 ± 11	127 ± 10	109 ± 9
	H ₂ O ₂	572 ± 49	533 ± 57	595 ± 51
ЦД	Fe ²⁺	321 ± 27	411 ± 35	375 ± 39
	H ₂ O ₂	2215 ± 213	2399 ± 227	2423 ± 251
ЦД+МФПЗ	Fe ²⁺	335 ± 23	371 ± 29	229 ± 21 ²
	H ₂ O ₂	2275 ± 205	2238 ± 194	1479 ± 118 ²
	H ₂ O ₂	2408 ± 213	1875 ± 175 ^{2,3}	653 ± 61 ^{1,2,3}

Примітки: 1 – відмінності статистично недостовірні в порівнянні з контролем, p > 0,05;

2 – відмінності статистично достовірні в порівнянні з ЦД, p < 0,05;

3 – відмінності статистично достовірні в порівнянні з ЦД+МФПЗ, p < 0,05.

Однією з причин високого рівня як початкових, так і кінцевих продуктів ПОЛ в плазмі крові можуть бути виснаження і порушення в роботі антиоксидантних систем. Так було показано, що при експериментальному ЦД спостерігається значне зниження активності каталази та супероксидисмутази еритроцитів. До того ж деякі антиоксидантні системи, наприклад SH-глутатіонпероксидаза, є енергозалежними. А при ЦД в першу чергу порушується забезпечення клітин і тканин енергією, до того ж на тлі активації процесів ПОЛ. Таким чином, виникає позитивний зворотній зв'язок, який виражається в тому, що порушення в механізмі утилізації глюкози призводить до інтенсифікації ПОЛ, що, в свою чергу, збільшує порушення в механізмах метаболізму. Ці порушення проявляються не тільки в нераціональному витрачанні неестерифікованих жирних кислот. При патологічних рівнях ПОЛ змінюється спектр ненасичених ліпідів в мембранах клітин, зменшується в'язкість мембран, а це призводить до зміни фізико-хімічних характеристик мікрооточення ферментів, які вбудовані в мем-

брану, і до зменшення їх активності. Крім того, можливе безпосереднє пошкодження молекул білка, в тому числі ферментів, а також антиоксидантів ліпідними радикалами [3]. Таким чином, зменшення інтенсивності ПОЛ при ЦД є актуальною задачею, і, як видно з представлених результатів, використані препарати сприяють нормалізації рівня ПОЛ в крові.

При цій патології підвищений рівень ПОЛ характерний не тільки для сироватки крові, але і для других тканин і органів, зокрема для печінки (табл. 3). У тому випадку, коли ЦД не лікували, початковий, спонтанний та Fe²⁺-індукований рівень ТБКАП в гомогенаті печінки під час всього періоду спостереження перевищує контрольний рівень в 1,4-1,6 рази. Аскорбат-індукований рівень на 7-у добу перевищує контроль в 2,2 рази, а на 30-у добу дещо зменшується і перевищує контроль в 1,9 рази. Введення препарату призводить до достовірного зниження на 30-ту добу спостереження показників ПОЛ відносно нелікованих тварин.

Таблиця 3

Рівень накопичення ТБКАП в гомогенаті печінки щурів з ЦД і при уведенні МФПЗ

Рівень ТБКАП, нмоль/мг тканини	Термін спостереження, доби	Умови експерименту		
		Контроль	ЦД	ЦД+МФПЗ
Початковий	7	3,9 ± 0,3	5,4 ± 0,4	5,1 ± 0,3
	30	3,8 ± 0,2	5,2 ± 0,3	4,8 ± 0,30 ³
Спонтанний	7	4,7 ± 0,3	6,7 ± 0,5	6,7 ± 0,4
	30	4,4 ± 0,2	6,5 ± 0,4	5,1 ± 0,3 ^{1,2,3}
Fe ²⁺ -індукований	7	5,4 ± 0,4	8,7 ± 0,7	8,8 ± 0,5
	30	5,8 ± 0,5	8,1 ± 0,4	7,3 ± 0,5
Аскорбат-індукований	7	9,2 ± 0,6	20,1 ± 1,8	20,7 ± 1,1
	30	9,4 ± 0,7	18,4 ± 1,1	14,9 ± 0,9 ^{2,3}

Примітки: 1 – відмінності статистично недостовірні в порівнянні з контролем, p > 0,05;

2 – відмінності статистично достовірні в порівнянні з 7-ю добою, p < 0,05;

3 – відмінності статистично достовірні в порівнянні з тим же строком ЦД, p < 0,05.

Характер різних моментів процесу ПОЛ в печінці, досліджених методом ХЛ (табл. 4), вказує на те, що при ЦД активується утворення вільних радикалів в тканині органа (ХЛ, стимульована Fe²⁺), зменшується стій-

кість до перекисного окислення (ХЛ, стимульована H₂O₂). Спостерігається також значне збільшення світлосуми ХЛ після попередньої інкубації гомогенату з Fe²⁺ та аскорбатом (неферментативна активація процесів

ПОЛ) – в 6,6 та 4,1 рази відповідно. Таким чином, при даній патології страждають всі вивчені ланки антиоксидантного захисту та механізмів регуляції рівня ПОЛ в тканині

печінки. МФПЗ в більшій або меншій мірі сприяють зменшенню всіх показників, що характеризують початкові етапи ПОЛ.

Таблиця 4

Світлосума ХЛ (умовні одиниці та нормативні значення) гомогенату печінки щурів з ЦД та при різних способах його лікування

Умови експерименту	Термін спостереження, діб	Індуктор ХЛ			
		Fe ²⁺	H ₂ O ₂	Fe ²⁺ після 15 хв інкубації з Fe ²⁺	Fe ²⁺ після 15 хв інкубації з аскорбатом
Контроль	7	2491 ± 218	241045 ± 21413	13427 ± 1412	5229 ± 427
	30	2783 ± 231	225189 ± 20837	10132 ± 927	5899 ± 422
ЦД	7	35419 ± 3219	983237 ± 95817	88273 ± 7921	21239 ± 2433
	норм. знач.	14,2	4,1	6,6	4,1
	30	21150 ± 2035	672281 ± 29486	67236 ± 5129	17187 ± 1429
	норм. знач.	7,6	2,3	6,6	2,9
ЦД+МФПЗ	7	33891 ± 3020	968813 ± 81241	86179 ± 7353	22075 ± 1890
	норм. знач.	13,6	4,0	6,4	4,2
	30	10175 ± 973 ²	413127 ± 37213 ²	25921 ± 2117 ²	12139 ± 1094 ²
	норм. знач.	3,7	1,8	2,6	2,1

Примітки: 1 – відмінності статистично недостовірні в порівнянні з контролем, p>0,05;
2 – відмінності статистично достовірні в порівнянні з ЦД, p<0,05.

Наведені дані дозволяють зробити висновок, що трансплантація мікрофрагментів підшлункової залози новонароджених поросят щурам з аллоксановим діабетом сприяє зменшенню рівня глюкози в крові протягом вже першого місяця після операції, а також зменшують рівень ПОЛ в сироватці крові та пе-

чінці.

Перспективи подальших розвідок у даному напрямку. Подальша розробка в даній області хірургії полягає у використуванні лапароскопічної трансплантації острівцевих клітин підшлункової залози у хворих на ЦД.

ЛІТЕРАТУРА

1. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. // Метод. реком.-СПб.:ИКФ Фолиант. 2000. 104 с.
2. Демин Ю.А. // Проблемы криобиологии. 2000. № 2. С. 94-101.
3. Климов А.Н., Никульчева Н.Г. Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения.-СПб.1999. 12 с.
4. Ковальська І. О. // Трансплантологія. 2000. Т. 1. № 1. С. 140-142.
5. Сандомирский Б.П., Волкова Н.А., Гальченко С.Е., и др. // Проблемы криобиологии. 2000. № 2. С. 76-80.
6. Турчин І.С. // Эндокринология. 1996. Т. 1. № 2. С. 6-13.
7. Federlin K., Pozza G. // J. Mol. Med. 1999. Vol.77. № 1. P. 148-152.
8. Fiorina P., Folli F., Bertuzzi F. et al. // Diabetes Care. 2003. Vol. 26. № 4. P. 1129-1136.
9. Movahedi B., Keymeulen B., Lauwers M.H. et al. // Transpl. Int. 2003. Vol. 16. № 3. P. 186-190.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ КСЕНОТРАНСПЛАНТАЦИИ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ КУЛЬТУР МИКРОФРАГМЕНТОВ ОСТРОВКОВОЙ ТКАНИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

О.Н. Побеленский

Дорожная клиническая больница станции Харьков Южной железной дороги

РЕЗЮМЕ

В работе проведены экспериментальные исследования влияния трансплантации под капсулу почки криоконсервированных микрофрагментов поджелудочной железы новорожденных поросят на уровень гликемии и показатели перекисного окисления липидов у крыс с аллоксановым диабетом

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: сахарный диабет, перекисное окисление липидов, микрофрагменты поджелудочной железы, гликемия

EXPERIMENTAL SUBSTANTIATION FOR XENOTRANSPLANTATION EFFICIENCY OF CRYOPRESERVED CULTURES OF THE PANCREAS ISLET TISSUE MICROFRAGMENTS AT DIABETES MELLITUS

O.N. Pobelensky

Railway Clinical Hospital st. Kharkov South Railway

SUMMARY

Experimental investigations of transplantation effect under the capsule of kidney of the newborn piglet's pancreas cryopreserved microfragments on glycemia level and the indices of lipid peroxidation in rats with alloxan diabetes were carried-out in the work.

KEY WORDS: diabetes mellitus, lipid peroxidation, microfragments of pancreas, glycemia