## Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ’Я УКРАЇНИ

ЛУГАНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

**СЕЛЕЗНЬОВА Олена Вікторівна**

УДК 616.379-008.64-028.77+616.37-018-089.843]-092

**ВПЛИВ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ КУЛЬТУР КЛІТИН
ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ І СТОВБУРОВИХ КЛІТИН
НА ПАТОГЕНЕЗ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО
ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ**

14.03.04 – патологічна фізіологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

ЛУГАНСЬК – 2008

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Донецькому національному медичному університеті
ім. М. Горького МОЗ України і Інституті невідкладної та відновної хірургії
ім. В.К. Гусака АМН України

**Науковий керівник:** доктор медичних наук, старший науковий співробітник **Зінкович Ігор Іванович**, Донецький національний медичний університет ім. М. Горького МОЗ України, завідувач Центральної науково-дослідної лабораторії

**Офіційні опоненти:**

доктор медичних наук, професор **Комаревцев Віталій Миколайович**, Луганський державний медичний університет МОЗ України, завідувач кафедрою хірургії та
урології

доктор медичних наук, старший науковий співробітник **Нещерет Олександр Павлович**, Інститут ендокрино­логії та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка АМН України (м. Київ), провідний науковий співробітник відділу епідеміології ендокринних захворювань

Захист відбудеться "\_\_\_"\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 2008 року о \_\_\_\_ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 29.600.02 при Луганському державному медичному університеті (91045, м. Луганськ, кв. 50-річчя Оборони Луганська, 1)

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Луганського державного ме­дич­ного університету (91045, м. Луганськ, кв. 50-річчя Оборони Луганська, 1).

Автореферат розісланий "\_\_\_"\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 2008 року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради, доцент Шанько В.М.

**ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ**

**Актуальність теми.** Поширеність цукрового діабету у світі зростає з кожним роком, причому багато ендокринологів указують на те, що захворю­ваність на цукровий діабет уже сьогодні носить характер пандемії. Кількість хворих на цукровий діабет подвоюється кожні 10-15 років (Ковальська І.О., 2000). Вважається, що поширеність цукрового діабету становить близько 10 %. В Україні кількість хворих на цукровий діабет становить близько 5 млн осіб (Ефимов А. и др., 2004). Цукровий діабет призводить до зменшення тривалості життя, зниження його якості, високої інвалідизації. Проблеми забезпечення стабільності перебігу цукрового діабету і боротьба з вторинними ускладненнями залишаються актуальними.

Найважливішою ланкою патогенезу цукрового діабету є загибель бета-клітин. Останні дослідження in vitro показують, що бета-клітини мають достат­ньо високу здатність до регенерації (Dor Y. et al., 2004), але, з іншого боку, in vivo в умовах діабету ці клітини практично не відновлюються (Jonas J.-C. et al., 1999). У світовій літературі описано багато досліджень, спрямованих на пошук засобів, здатних активувати регенерацію бета-клітин (Rooman I. et al., 2002; Pospisilik J.A et al., 2003).

Одним із перспективних методів є трансплантація бета-клітин (Hussain M.A. et al., 2004; Kin T. et al., 2005). Живі бета-клітини забезпечують адекватну регуляцію рівня глюкози у крові відповідно до потреб організму, чого неможливо досягти замісною терапією інсуліном. Перші результати клініч­них випробувань трансплантації культур бета-клітин виявилися неоднозначними. З одного боку, її ефективність спочатку є високою, потім, у результаті природного імунологічного відторгнення, трансплантат гине, але тяжкість діабету знижується, тобто трансплантація має і деякий період післядії. Деякі автори (Mickel R. et al, 2005) припускають, що трансплантація культур клітин може активувати регенерацію збережених острівців у підшлунковій залозі реципієнта.

Крім того, відомо, що стовбурові клітини організму мають здатність до специфічної міграції в місця ушкодження тканин, прискорюють проліферацію клітин, сприяють ангіонеогенезу, можують диференціюватися у різні типи клітин як паренхіми, так і строми (Miranda D. et al., 2002). Деякі автори (Goto M. et al., 2004; Wang J. et al., 2004) припускають, що стовбурові клітини можуть брати участь у регенерації острівкових клітин.

Тому було вирішено розширити знання про вплив трансплантації острівкових клітин на регенерацію бета-клітин у реципієнта і ступінь корекції метаболічних і морфологічних порушень в організмі щурів з алоксановим діабетом. Встановлення характеру патофізіологічних змін в організмі після трансплантації культур клітин підшлункової залози і стовбурових клітин допоможуть довести або спростувати доцільність даних методів лікування.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Робота є фраг­ментом комплексної теми «Дослідження імунонейроендокринних порушень при ендокринній недостатності підшлункової залози і її корекція трансплантацією фетальних тканин», № держреєстрації 0101U007988, шифр МК 02.1.07, що виконувалась на кафедрі мікробіології, вірусології і епідеміології Донецького державного медичного університету ім. М. Горького. У рамках цієї НДР здобувачка виконала дослідження змін показників вуглеводного й жирового обміну при експериментальному цукровому діабеті після трансплантації культури клітин підшлункової залози.

**Мета дослідження:** удосконалити знання про вплив трансплантації культур клітин підшлункової залози і стовбурових гемопоетичних клітин на патогенез експериментального цукрового діабету на підставі вивчення особливостей вуглеводного, жирового обміну і морфологічних змін в ендокринній частині під­шлункової залози, вираженості діабетичної мікроангіопатії після трансплантації.

Для досягнення поставленої мети сформульовані наступні **завдання дослідження:**

Вивчити вплив трансплантації культур клітин підшлункової залози і стовбурових клітин на вуглеводний обмін в умовах експериментального цукрового діабету.

Дослідити морфологічні зміни острівкового апарату підшлункової залози після трансплантації культур клітин підшлункової залози і стовбурових клітин в умовах експериментального цукрового діабету.

З'ясувати особливості жирового обміну в умовах експериментального цукрового діабету після трансплантації культур клітин підшлункової залози і стовбурових клітин.

Встановити морфологічні особливості стану дрібних артеріальних судин у щурів в умовах експериментального цукрового діабету після трансплан­тації культур клітин підшлункової залози й стовбурових клітин.

*Об'єкт дослідження:* патогенез експериментального алоксанового цукрового діабету, відтвореного на щурах.

*Предмет дослідження:* вплив трансплантації культур клітин підшлункової залози і стовбурових клітин на патогенез експериментального цукрового діабету.

*Методи дослідження:* дослідження проведене комплексно із використанням біохімічних, морфологічних, імуногістохімічних, морфометичних методів, виконано статистичну обробку отриманих даних.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше встановлені закономірності впливу трансплантації культур клітин підшлункової залози і стовбурових гемопоетичних клітин на основні механізми розвитку експериментального цукрового діабету та його ускладнень.

Доведено, що внутрішньочеревна трансплантація культури алогенних гемопоетичних стовбурових клітин і культури ксеногенних клітин підшлун­кової залози призводить до поліпшення перебігу експериментального алоксанового цукрового діабету. Удосконалені знання щодо розвитку компенсаторних процесів у підшлунковій залозі при експериментальному алоксановому діабеті, встановлена можливість синтезу інсуліну деякими ацинарними і протоковими клітинами підшлункової залози. Вперше одержані відомості про характер і вираженість компенсаторних процесів у підшлунковій залозі, що виникають після виконання трансплантації культури алогенних гемопоетичних стовбурових клітин і культури ксеногенних клітин підшлун­кової залози. Встановлено, що трансплантація клітинних культур прискорює регенераторні процеси в острів­ковому апараті підшлункової залози, що відображається у збільшенні питомого об’єму острівкової тканини, збільшенні кількості інсулін-позитивних клітин на одиницю площі, прискорення пролі­ферації острівкових клітин, збільшення кіль­кості і розміру острівців за рахунок збільшення кількості клітин, част­ки інсулін-позитивних клітин у складі острівців. Вперше встанов­лено, що транс­план­тація культури клітин підшлункової залози призводить до прис­­ко­рення поділу зрілих бета-клітин реципієнта, а трансплантація культури стовбурових клі­тин призводить до акти­вації проліферації прогеніторних незрілих клітин із наступним їх дозріванням у бета-клітини. Показано, що така перебудова ендо­крин­ної частини підшлункової залози призводить до зменшення порушень вугле­водного і ліпідного обмінів та призупинення розвитку мікроангіопатії судин серця.

**Практичне значення одержаних результатів.** Одержані дані можуть бути використані для подальшої розробки трансплантологічних методів ліку­ван­ня цукрового діабету у людей. Нові ланки патогенезу цукрового діабету після трансплантації клітинних культур, встановлені під час здійсненого дослідження, зазначили нові можливості корекції інсулінової недостатності: сти­му­лювання проліферації клітин, що синтезують інсулін, стимулювання про­лі­­фе­рації клітин-попередників підшлункової залози та їх подальшої транс­фор­мації у бета-клітини. Швидкий позитивний ефект від трансплантації куль­тури клітин підшлункової залози та віддалений, але більш виразний, ефект від транс­плантації культури стовбурових клітин надає можливість вибору най­більш раціо­нального напрямку терапії хворих на цукровий діабет. Відмін­ність меха­нізмів впливу цих методів на регенерацію острівкових клітин визна­чає мож­ливість отримання більш виразного ефекту від комбінованого їх застосування.

Встановлені знання про вплив трансплантації клітин ксеногенної куль­тури підшлункової залози та алогенної культури гемопоетичних стовбурових клітин на перебіг експериментального цукрового діабету можуть бути викорис­тані при подальших фундаментальних дослідженнях, доопрацюванні методів із метою їх використання в комплексній терапії захворювання у людей. Також ці дані можливо використовувати у процесі навчання студентів медичних ВНЗ на кафедрах патологічної фізіології для більш глибокого розуміння впливу цих методів на патогенез цукрового діабету 1 типу.

Отримані результати впроваджені у навчальний процес кафедр пато­фізіології Тернопільського державного медичного університету ім. І.Я. Горба­чевського, Запорізького державного медичного університету, Донецького національного медичного університету ім. М. Горького, кафедри фізіології Буковин­ського державного медичного університету, кафедри фармакології Харківського медичного університету.

**Особистий внесок здобувача.** Автором самостійно проведені наступні види робіт: патентний та інформаційний пошук, виконання експериментальних досліджень, збір матеріалу для подальшого аналізу, морфометричне дослід­жен­ня стану острівкового апарату підшлункової залози, ста­тис­тичний аналіз одержаних даних біохімічних, морфологічних і морфо­метричних методів дослідження, оформлення наукових статей до друку, що відобра­жають основні наукові положення дослідження, написання всіх розділів дисертаційної роботи, представлення результатів дослідження на наукових з’їздах і конференціях.

Сумісно із науковим керівником здійснено вибір теми дисертаційної роботи, постановка мети і завдань дослідження, планування експерименту, інтерпретація одержаних результатів і формулювання висновків.

У роботах, виконаних у співавторстві, реалізовані наукові ідеї здобувачки. Співавторами здійснювалося допомога у виконанні біохімічних, морфологічних і морфометричних методів дослідження, консультація щодо статистичної обробки результатів дослідження та їх інтерпретації. Дисертантом не були використані результати та ідеї співавторів публікацій.

**Апробація результатів дисертації.** Основні наукові положення та вис­нов­ки дисертаційної роботи доповіданні і обговорювані на: науковій конфе­рен­ції «IV читання ім. В.В. Підви­соць­кого» (м. Одеса, 26-28 травня 2005 р.), II Міжнародній науково-практичній конференції «Гомеостаз: фізіологія, пато­ло­гія, фармакологія і клініка» (м. Одеса, 8-9 вересня 2005 р.), XVII з’їзді Укра­їн­ського фізіологічного товариства (м. Чернівці, 18-20 травня 2006 р.), науковій конференції «Актуальні питання патофізіології» (мм. Симферополь-Ялта, 5-6 жовтня 2006 р.), IX Україн­сь­кому біохімічному з’їзді (м. Харків, 24-27 жовтня 2006 р.), VII з’їзді асоціації ендо­кринологів України (м. Київ, 15-18 травня 2007 р.), Науковій конференції «VI читання ім. В.В. Підвисоцького» (м. Одеса, 31 травня – 1 червня 2007 р.).

**Публікації.** Результати дисертаційної роботи опубліковані в 13 наукових працях, з них 6 – у фахових журналах, рекомендованих ВАК України, 1 – стаття у збірнику, 6 – у матеріалах конференцій.

**Структура дисертації.** Робота викладена на 158 сторінках, з них на
19 сторінках наведено 15 таблиць і 47 рисунків. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, 4 розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення одержаних резуль­татів, висновків і переліку використаних літературних джерел. Перелік містить 172 джерела, з них 52 – вітчизняної та 120 – іноземної літератури.

**ОСНОВНИЙ ЗМІСТ**

**Матеріал і методи дослідження.** Експеримент проводили на 85 лабораторних білих щурах (самцях). Середня маса тварин перед початком експерименту становила 235,4±24,5 г. Контрольну групу склали 10 тварин, які утримувалися в тих же умовах, що й тварини експериментальних груп.

Цукровий діабет моделювали на 75 тваринах шляхом внутрішньо­черев­ного введення водного розчину алоксану (Fluka, Німеччина) в дозі 200 мг/кг. Після введення алоксану у 3 (4,0%) тварин розвинувся вкрай тяжкий стан із гіперглікемією вище 30 ммоль/л, тому вони були виведені із експерименту на 3-4 добу. На 30 добу після розвитку в щурів цукрового діабету для подальшого експерименту було відібрано 65 щурів зі станом середньої тяжкості (з рівнем глюкози крові натще від 8 до 16 ммоль/л). З них 3 тварини виведені з експерименту для одержання даних про зміни у структурі підшлункової залози перед трансплантацією (контроль моделі).

Тварини були поділені на 4 експериментальні групи. Тваринам 1 групи (14 щурів) трансплантацію клітинних культур не проводили, на 30 добу експерименту їм внутрішньочеревно вводили 1 мл стерильного фізіологічного розчину натрію хлориду. Тваринам 2 групи (24 щура) на 30 добу вводили внут­рішньочеревно культуру острівкових клітин підшлункової залози (ПШЗ). На 38 добу 12 тваринам цієї групи повторно ввели аналогічну культуру (група 2Б), тварини, що залишися, склали групу 2А. Тваринам 3 групи (12 щурів) на 30 добу експерименту вводили внутрішньо­черевно зруйновану шляхом дворазо­вого циклу заморожування-розморо­жування культуру острівкових клітин ПШЗ. Тваринам 4 групи (12 щурів) на 30 добу однократно внутрішньо­черевно вводили культуру гемопоетичних стовбурових клітин. Для отримання проміжних морфометричних результатів на 45 добу експерименту по 3 тварини з кожної групи виводили з експерименту. Всі інші тварини були виведені з експерименту на 70 добу. В усі терміни тварин виводили з експерименту шляхом декапітації під загальною анестезією кетаміном в дозі 75 мг/кг.

Культури алогенних гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК) і ксеногенних кролячих ендокринних клітин підшлункової залози були отримані у лабораторії клітинного та тканинного культивування Інституту невідкладної і відновної хірургії ім. В.К.Гусака АМН України. Приготування культури алогенних ГСК включало наступні етапи: вилучення ембріонів 14 днів гестації, вилучення ембріональної печінки, механічну дезагрегацію та фільтрацію через декілька фільтрів, висів на культуральні флакони з поживним ростовим середовищем DMEM/F12, культивування протягом 1 години при 37°С, відбір надосадової рідини із клітинами, що не прикріпилися до флакону. Гемопоетична популяція клітин залишалася у надосадній рідині через свої неадгезивні (субстрат-незалежні) властивості. Отриману суспензію розділяли на порції об’ємом 0,3 мл і терміново вводили щурам-реципієнтам. Для детекції ГСК використовували імунотипування клітин на проточному цитометрі FACSCalibur (Becton Dickinson, США). Було встановлено, що клітинна суспензія ембріональної печінки містила 61 млн. клітин, які містили ядро, на
1 мл, серед яких CD90(Thy-1.1)+/CD3–/CD45RC– клітини склали 0,27% (за свідченням багатьох авторів (Castagnola C. et al., 1982, McCarthy K.F. et al., 1987), саме ця популяція клітин щурів містить велику кількість ГСК), тобто у одній трансплантаційній порції містилося біля 50 тис. ГСК.

Культуру острівкових клітин кроля отримували за наступною схемою (Шумаков В.И. и др., 1995): видалення у кроля віком 2 тижні підшлункової залози, пунктирування протоку із введенням 0,25% розчину трипсину, механічна дезагрегація і глибока трипсинізація, центрифугування. Після видалення супернатанту у клітинний осад додавали поживне середовище Ігла. Життєздатність клітин перевіряли у камері Горяєва із одномоментним підрахунком їх кількості. Концентрація життєздатних клітин в 1 мл суспензії становила 2,5 млн/мл. Далі первинну суспензію розводили та розділяли на порції по 0,3 мл, кожна з котрих містила 50 тис. клітин. Культуру терміново вводили щурам-реципієнтам. Встановлено, що культура острівкових клітин ПШЗ містила 73,7% бета-клітин, 20,6% – альфа-клітин і 5,7% інших клітин.

Визначення рівня глюкози, ТГ, ЗХ і холестерину ЛПНЩ і ЛПВЩ проводили на напів­автоматичних біохімічних аналізаторах. Індекс атеро­ген­ності (ІА) розраховували за стандартною формулою: ІА=(ЗХ–ЛПВЩ)/ЛПВЩ. Вміст інсуліну визначали за допомогою імуноферментного аналізу.

Морфологічне і морфометричне дослідження проведене у лабораторії фундаментальних досліджень Інституту невідкладної і відновної хірургії ім.. В.К.Гусака АМН України. З видалених тканин виготовляли забарвлені гема­токсиліном та еозином препарати за стандартною методикою (Меркулов Г.А.., 1969). При імуногістохімічному забарвленні використовували первинні анти­тіла проти інсуліну (поліклональні, мурчакові), глюкагону (поліклональні, кролячі) та ядерного антигену клітин, що проліферують, – PCNA (монокло­нальні, клон PC10). Первинні антитіла виявляли за допомогою системи візуалізації «LSAB 2 for rat» (всі реактиви фірми DAKO, Данія).

Для підтвердження припущень щодо механізму впливу клітинних культур на острівковий апарат ПШЗ було виконано потрійне імунофлюо­ресцентне фарбування тканини залози у 3 тварин кожної групи на 45 та 70 добу експерименту.. Для цього використовували антитіла проти інсуліну, PCNA, а також DAPI в якості ядерного барвника. Первинні антитіла виявляли за допомогою вторинних із флуоресцентними мітками таким чином, щоб ядра клітин, що діляться, забарвлювались у червоний колір, інших клітин – у синій, цитоплазма інсулін-позитивних клітин – у зелений колір.

Дослідження препаратів здійснювали на мікроскопі Axiostar (Carl Zeiss, Німеччина). Мікрофотографування проводили на дослідницькому мікроскопі Olympus AX70 (Японія) цифровою камерою Olympus DP50, морфометрічне дослідження – з використанням програми AnalySIS Pro 3.2 (фірма SoftImaging, Німеччина).

Морфометричне дослідження стану острівкового апарату проводили на забарвлених імуногістохімічно препаратах. Підраховували загальну кількість клітин в острівцях, кількість клітин, в ядрах яких експресується PCNA-антиген (клітини, що знаходяться у процесі поділу), кількість клітин, що містять у цитоплазмі інсулін і глюкагон, виміряли розмір кожного острівця. Для вивчення мікроангіопатії було обрано серце. Під час морфометричного дослідження судин серця вимірювали мінімальний внутрішній і зовнішній діаметри певної судини і вираховували радіус, абсолютну та відносну товщину стінки судини. Оскільки діаметр вивчених судин коливався від 10 до 150 мкм, то вони було розподілені на три групи: а) дрібні артерії з діаметром від 75 до 150 мкм; б) артеріоли з діаметром від 25 до 75 мкм; в) прекапілярні артеріоли з діаметром менше 25 мкм.

Статистичну обробку проводили за допомогою програми статистичного аналізу Primer of Biostatistics 4.03 (США) і Statistica 6.0 (StatSoft, США). Розбіжності між групами розраховувалися із використанням непараметричного критерію Крускала-Уолліса. Зв'язок між параметрами оцінювали за допомогою коефіцієнту рангової кореляції Спірмена.

**Результати досліджень.** Після введення алоксану через 30 діб у тварин розвивалася типова картина інсулін-залежного цукрового діабету із підвищен­ням середнього рівня глюкози до 12,52±2,02 ммоль/л (табл.1), що в 2,9 рази вище в порівнянні з контролем (p<0,05). Ці зміни обумовлені масовою загибеллю клітин, що синтезують інсулін. Так, при морфометричному аналізі ПШЗ було встановлено, що середня кількість острівців на 10 мм2 зрізу зменшилась у 5,3 разів (p<0,05) (табл.2,3), а ті, що залишилися, стали маленькими, в 1,7 рази менше, ніж у нормі (p<0,05), що призвело до зменшення питомого об’єму острівкової тканини в 9,3 разів (p<0,05). У складі острівців, що збереглися, було лише 34,0±2,7% бета-клітин. Це знайшло відображення у зниженні кількості ІСК на одиницю площі в 20 разів (p<0,05). Також вста­новлено, що деякі ацинарні клітини набули здатність до секреції інсуліну. Такої трансформації найчастіше піддавалися або всі, або більшість клітин у певному ацинусі, тому всі групи мали округлу форму з наявністю невеликого просвіту в центрі, тобто мали морфологію екзокринного ацинуса. Також були виявлені поодинокі інсулін-позитивні клітини серед протокових епітеліо­цитів. Результатом зниження кількості клітин, що синтезують інсулін (ІСК), у залозі стало зниження рівня інсуліну крові у 51,5 разів (p<0,05). Але було встановлено прискорення ділення клітин у збережених острівцях в 6,0 разів у порівнянні із нормою (p<0,05). Порушення обміну вуглеводів призводить і до порушень жирового обміну, бо жири стають основним джерелом енергоутворення у багатьох клітинах. Так, спостерігали збільшення рівня ТГ в 2,6 рази (p<0,05) (табл.4), ЗХ – в 1,6 рази (p<0,05), холестерину ЛПНЩ – в 2,1 рази (p<0,05), зниження рівня холестерину ЛПВЩ в 1,8 рази (p<0,05). ІА збільшився в 4,5 разів у порівнянні з інтактними твари­нами і перевищив критичне значення (5,69±1,36 при нормі не більше 3,0). Дані зміни на 30 добу експериментального ЦД вказують на розвиток на даний термін типової картини діабетичної дисліпідемії. Надмірна глікемія із порушеннями ліпідного обміну є причинами розвитку мікроангіопатії. При гістологічному дослідженні судин серця було виявлено потовщення стінки прекапілярних артеріол, у дрібних арте­ріях спостерігали ознаки плазматичного просочування. Середня товщина стін­ки прекапілярних артеріол збільшилась у 1,4 рази (p<0,05) (табл.5), а відносна товщина – у 1,3 рази (p<0,01) (табл.6). Найбільш виразним було потов­щення стінок артеріол – абсолютної товщини у 1,6 рази (p<0,001), віднос­ної – у 1,4 рази (p<0,001). Потовщення стінок дрібних артерій було також від­чутним – абсолютної товщини – у 1,3 рази (p<0,001), відносної – у 1,4 рази (p<0,001).

Надалі (на 45 і 70 доби експерименту) спостерігали ознаки регенерації острівкової тканини. І хоча кількість острівців на одиницю площі не змінилася, у самих острівцях залишався високим процент клітин, що проліферують (табл.2,3), він був менший ніж на 30 добу, але значно вищий (в 4,3 рази на 45 добу і в 3,1 рази на 70 добу), ніж в інтактних тварин. Але прискорення проліферації клітин не відобразилося на питомому об’ємі острівкової тканини. Істотні зміни відбувалися у клітинному складі острівців. Якщо на 30 добу відносна кількість бета-клітин дорівнювала 34,0±2,7%, то на 45 добу вона вже була на рівні 45,9±3,8% (p<0,05), а на 70 добу – 60,2±3,9% (p<0,05). Тобто в острівцях відбувалося зменшення відсотку альфа-клітин, місце яких займали бета-клітини. Це призвело до зростання середньої кількості ІСК на одиницю площі залози в 1,3 рази (p<0,05) на 45 добу і в 1,9 рази (p<0,05) на 70 добу. Майже у стільки ж разів підвищився і рівень інсуліну в крові на 70 добу – в 2,0 рази. Результатом цього стало зменшення гіпер­глікемії на 45 добу у 1,1 рази (p<0,001) у порівнянні з 30 добою, та у 1,3 рази (p<0,001) на 70 добу, але цей рівень був набагато більше рівня глюкози у інтактних тварин – в 2,2 рази (p<0,001). При дослідженні показників жирового обміну встановлено достовірне збільшення рівня ТГ (в 2,7 рази, p<0,001), ЗХ (в 1,6 рази, p<0,001) і холестерину ЛПНЩ (в 1,9 рази, p<0,001), зниження рівня ЛПВЩ (в 1,6 рази, p<0,01). ІА був вище в 4,1 разів (p<0,001) ніж в інтактних тварин. Ступінь дисліпідемії практично не змінився, достовірної різниці між відповідними показниками не було. Тривала гіперглікемія і дисліпідемія призвели до прогресування мікроангіопатії: спостерігали різке потовщення стінки артерій усіх калібрів, стінки артеріол і дрібних артерій гіалінізовані. Збільшення абсолютної і відносної товщини стінки судин різного калібру склало від 1,9 до 2,3 рази у порівнянні із інтактними щурами (для всіх судин p<0,001). При порівнянні даних на 30 і 70 добу наявною є значна прогресія мікроангіопатії – відносна товщина судин достовірно зросла у 1,3-1,4 рази (p<0,01). Таким чином, незважаючи на деяке покращання показників вуглеводного обміну, наявною була прогресія мікроангіопатії.

Таблиця 1

Показники обміну вуглеводів у тварин різних експериментальних груп на 70 добу експерименту

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Група тварин | Глюкоза, ммоль/л | Інсулін, мкг/л |
| Контрольна (інтактні тварини) | 4,31±0,48 | 1,03±0,25 |
| Тварини на 30 добу експерименту | 12,94±1,47 | 0,02±0,01 |
| 1 група | 9,68±1,23 | 0,04±0,02 |
| 2А група | 6,65±0,61## | 0,24±0,08## |
| 2Б група | 6,14±1,11## | 0,43±0,09## |
| 3 група | 7,68±1,78# | 0,14±0,05## |
| 4 група | 5,82±0,80## | 0,63±0,14## |

Примітки: 1. Відмінності всіх показників у всіх експериментальних групах із відповідними показниками інтактних тварин достовірні при p<0,001, із показниками тварин, яких вивели з експерименту на 30 добу при p<0,05.

2.Вірогідність відмінностей показників із 1 групою тварин: # – p<0,05, ## – p<0,001.

Таблиця 2

Провідні морфометричні показники підшлункової залози у щурів різних груп на 45 добу експерименту

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Показник | Інтактні тварини(n=10) | На 30 добу експе­ри­менту (n=3) | На 45 добу експерименту |
| 1 група (n=3) | 2А група (n=3) | 2Б група (n=3) | 3 група (n=3) | 4 група (n=3) |
| Клітини, що проліферують, % | 1,04±0,14 | 6,20±2,07† | 4,44±0,62† | 16,73±3,67†,§,\* | 21,79±2,19†,§,\* | 15,42±1,09†,§,\* | 44,13±4,85†,§,\* |
| Питомий об’єм острівкової тканини, % | 0,93±0,10 | 0,10±0,01† | 0,10±0,01† | 0,18±0,03†,§,\* | 0,22±0,33†,§,\* | 0,14±0,02†,§,\* | 0,31±0,04†,§,\* |
| Середня кількість острівців на 10 мм2 | 11,70±1,62 | 2,21±0,37† | 1,99±0,14† | 4,00±0,51†,§,\* | 4,14±0,32†,§,\* | 3,70±0,16†,§,\* | 4,11±0,23†,§,\* |
| Середня кількість ІСК на 1 мм2 | 69,03±8,50 | 3,37±0,10† | 4,82±1,56† | 7,03±1,08†,§ | 8,48±0,52†,§,\* | 5,89±0,23†,§ | 11,02±1,77†,§,\* |
| Середня площа острівця, мкм2 | 8110,6±1056,6 | 4803,1±652,1† | 5554,6±604,6† | 5992,6±953,4† | 7435,6±614,8§,\* | 4271,8±337,9†,\* | 6178,0±482,3†,§ |
| Інсулін-позитивні клітини, % | 77,5±2,1 | 34,0±2,7† | 45,9±3,8†,§ | 32,4±5,5†,\* | 34,1±2,5†,\* | 40,4±2,7†,§ | 22,1±2,6†,§,\* |
| Глюкагон-позитивні клітини, % | 21,9±2,1 | 58,6±1,2† | 49,7±2,8†,§ | 60,1±4,5†,\* | 52,1±5,0†,§ | 51,3±0,9†,§ | 31,5±1,1†,§,\* |
| Інсулін- і глюкагон-негативні клітини, % | 0,54±0,20 | 7,35±1,56† | 7,09±1,01† | 7,38±1,21† | 13,66±2,67†,§,\* | 8,22±3,30† | 46,09±3,32†,§,\* |
| Відношення інсулін+ до глюкагон+ клітин | 3,57±0,39 | 0,58±0,06† | 0,93±0,13†,§ | 0,55±0,13†,\* | 0,66±0,11†,\* | 0,79±0,05†,§,\* | 0,70±0,07†,§,\* |
| Середня кількість кластерів інсулін-позитивних ацинарних клітин на 10 мм2 | - | 2,96±0,59 | 3,15±0,58 | 3,07±0,47 | 3,54±0,23 | 3,65±0,45 | 3,41±0,28 |
| Середня кількість клітин в кластері | - | 4,42±0,51 | 4,68±0,40 | 4,25±0,53 | 4,15±0,59 | 4,23±0,34 | 4,34±0,70 |

Примітки: 1. Вірогідність відмінностей із групою інтактних тварин: † – p<0,05. 2. Вірогідність відмінностей із групою тварин, які були виведені із експерименту на 30 добу: § – p<0,05. 3. Вірогідність відмінностей із 1 групою: \* – p<0,05.

Таблиця 3

Провідні морфометричні показники підшлункової залози у щурів різних груп на 70 добу експерименту

|  |  |
| --- | --- |
| Показник | На 70 добу експерименту |
| 1 група (n=9) | 2А група (n=8) | 2Б група (n=9) | 3 група (n=8) | 4 група (n=9) |
| Клітини, що проліферують, % | 3,20±0,41†††,§ | 8,64±1,37†††,\*\*\* | 11,47±2,26†††,\*\*\*,§ | 7,12±1,28†††,\*\*\* | 17,48±3,80†††,\*\*\*,§ |
| Питомий об’єм острівкової тканини, % | 0,11±0,02††† | 0,28±0,05†††,\*\*\*,§ | 0,36±0,03†††,\*\*\*,§ | 0,17±0,03†††,\*\*\*,§ | 0,55±0,10†††,\*\*\*,§ |
| Середня кількість острівців на 10 мм2 | 1,96±0,42††† | 4,30±0,56†††,\*\*\*,§ | 3,93±0,67†††,\*\*\*,§ | 3,82±0,93†††,\*\*\*,§ | 4,41±1,13†††,\*\*\* |
| Середня кількість ІСК на 1 мм2 | 6,41±0,66†††,§ | 11,06±2,55†††,\*\*\*,§ | 26,02±2,29†††,\*\*\*,§ | 7,50±1,25†††,\*,§ | 39,90±7,79†††,\*\*\*,§ |
| Середня площа острівця, мкм2 | 6066,4±1342,4†† | 6288,7±1567,8† | 9310,7±1257,8†,\*\*\*,§ | 4681,9±790,9†††,\* | 13890,3±5305,8†††,\*\*\* |
| Інсулін-позитивні клітини, % | 60,2±3,9†††,§ | 46,1±7,8†††,\*\*\*,§ | 71,7±2,4†††,\*\*\*,§ | 51,5±6,1†††,\*\*,§ | 77,6±1,7\*\*\*,§ |
| Глюкагон-позитивні клітини, % | 33,1±3,4†††,§ | 53,4±7,8†††,\*\*\* | 22,3±3,5\*\*\*,§ | 39,8±6,1†††,\*,§ | 19,5±2,2†,\*\*\*,§ |
| Інсулін- і глюкагон-негативні клітини, % | 6,75±2,52†††,§ | 0,45±0,12\*\*\*,§ | 6,04±1,54††† | 8,67±2,55†††,§ | 2,93±1,17†††,\*\*\*,§ |
| Відношення інсулін+ до глюкагон+ клітин | 1,85±0,32†††,§ | 0,90±0,32†††,\*\*\*,§ | 3,30±0,60\*\*\*,§ | 1,34±0,37†††,\*\*,§ | 4,03±0,54†,\*\*\*,§ |

Примітки: 1. Вірогідність відмінностей із групою інтактних тварин: † – p<0,05, †† – p<0,01, ††† – p<0,001. 2. Вірогідність відмінностей із групою тварин, які були виведені із експерименту на 30 добу: § – p<0,05. 3. Вірогідність відмінностей із 1 групою: \* – p<0,05, \*\* – p<0,01, \*\*\* – p<0,001.

Таблиця 4

Основні показники ліпідного обміну у щурів різних груп

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Показник | Інтактні щури (n=10) | На 30 добу експери­менту (n=3) | На 70 добу експерименту |
| 1 група (n=9) | 2А група(n=8) | 2Б група(n=9) | 3 група(n=8) | 4 група(n=9) |
| ТГ, ммоль/л | 0,47±0,07 | 1,23±0,10† | 1,27±0,20††† | 0,68±0,15††,§,\*\*\* | 0,65±0,13††,§,\*\*\* | 0,87±0,22†††,§,\*\* | 0,54±0,09§,\*\*\* |
| ЗХ, ммоль/л | 1,03±0,12 | 1,69±0,04† | 1,69±0,16††† | 1,35±0,16†††,§,\*\*\* | 1,32±0,14††,§,\*\*\* | 1,50±0,29†† | 1,10±0,13§,\*\*\* |
| ЛПВЩ, ммоль/л | 0,46±0,07 | 0,26±0,05† | 0,29±0,08†† | 0,37±0,11 | 0,41±0,10§,\* | 0,33±0,06†† | 0,42±0,07§,\*\* |
| ЛПНЩ, ммоль/л | 0,37±0,06 | 0,77±0,05† | 0,72±0,08††† | 0,64±0,17†† | 0,57±0,10†††,§,\*\* | 0,71±0,21†† | 0,44±0,08†,§,\*\*\* |
| ІА | 1,27±0,18 | 5,69±1,36† | 5,25±1,49††† | 2,96±1,15†††,§,\*\* | 2,34±0,59†††,§,\*\*\* | 3,67±0,98†††,§ | 1,62±0,21††,§,\*\*\* |

Примітки: 1. Вірогідність відмінностей із інтактними тваринами: † – p<0,05, †† – p<0,01, ††† – p<0,001. 2. Вірогідність відмінностей із групою тварин, які були виведені із експерименту на 30 добу: § – p<0,05. 3. Вірогідність відмінностей із 1 групою: \* – p<0,05, \*\* – p<0,01, \*\*\* – p<0,001.

Таблиця 5

Середня абсолютна товщина стінки судин у тварин різних груп на 70 добу експерименту

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Групи | Дрібні артерії (діаметр більше 75 мкм) | Артеріоли (діаметр від 25 до 74 мкм) | Прекапілярні артеріоли (діаметр менше 25 мкм) |
| Інтактні щури | 15,29±2,25 | 9,05±2,83 | 3,27±0,98 |
| Тварини перед трансплантацією (30 доба) | 19,81±2,07\*\*\* | 14,47±3,07\*\*\* | 4,58±1,24\* |
| Група 1 | 28,86±4,05\*\*\*,††† | 17,05±5,45\*\*\* | 7,66±0,77\*\*\*,† |
| Група 2А | 26,44±3,75\*\*\*,†††,## | 13,95±3,64\*\*\*,# | 5,77±1,98\*\*\* |
| Група 2Б | 22,32±3,40\*\*\*,††,### | 13,50±4,04\*\*\*,## | 4,76±1,66\*\*,# |
| Група 3 | 26,15±3,72\*\*\*,†††,### | 15,18±4,09\*\*\* | 6,02±1,54\*\*\* |
| Група 4 | 19,03±2,68\*\*\*,### | 12,21±3,17\*\*\*,†,### | 4,76±0,95\*\*\*,## |

Примітки: 1. \* – вірогідність відмінностей від групи інтактних щурів: \* – p<0,05, \*\* – p<0,01, \*\*\* – p<0,001. 2. † – вірогідність відмінностей від групи тварин перед трансплантацією (30 доба експерименту): † – p<0,05, †† – p<0,01, ††† – p<0,001. 3. # – вірогідність відмінностей від 1 групи: # – p<0,05, ## – p<0,01, ### – p<0,001.

Таблиця 6

Середня відносна товщина стінки судин у тварин різних груп на 70 добу експерименту

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Групи | Дрібні артерії (діаметр більше 75 мкм) | Артеріоли (діаметр від 25 до 74 мкм) | Прекапілярні артеріоли (діаметр менше 25 мкм) |
| Інтактні щури | 27,37±4,57 | 38,03±4,72 | 36,85±5,64 |
| Тварини перед транс­плантацією (30 доба) | 37,38±5,77\*\*\* | 51,46±3,29\*\*\* | 49,33±5,85\*\* |
| Група 1 | 51,19±7,27\*\*\*,††† | 68,67±6,99\*\*\*,††† | 68,46±2,05\*\*\*,†† |
| Група 2А | 44,45±6,08\*\*\*,†††,### | 59,54±7,47\*\*\*,†††,### | 59,63±9,55\*\*\*,†† |
| Група 2Б | 41,87±5,42\*\*\*,††,### | 55,65±10,42\*\*\*,†,### | 50,74±14,27\*\*\*,## |
| Група 3 | 47,21±5,93\*\*\*,†††,## | 62,51±7,89\*\*\*,†††,### | 58,66±7,57\*\*\*,††,# |
| Група 4 | 34,96±4,63\*\*\*,### | 51,05±9,01\*\*\*,### | 48,68±2,70\*\*\*,### |

Примітки: 1. \* – вірогідність відмінностей від групи інтактних щурів: \* – p<0,05, \*\* – p<0,01, \*\*\* – p<0,001. 2. † – вірогідність відмінностей від групи тварин перед трансплантацією (30 доба експерименту): † – p<0,05, †† – p<0,01, ††† – p<0,001. 3. # – вірогідність відмінностей від 1 групи: # – p<0,05, ## – p<0,01, ### – p<0,001.

Після одноразового введення культури острівкових клітин ПШЗ (група 2А) відмічали значне прискорення регенерації острівкової тканини. По-перше, підвищилась середня кількість острівців на одиницю площі: на 45 добу – в 2,0 рази (p<0,05), на 70 добу – 2,2 рази (p<0,001) у порівнянні із тваринами 1 групи. Основою цих змін було прискорення проліферації клітин в острівцях в 3,8 рази (p<0,05) на 45 добу і в 2,7 разів (p<0,001) на 70 добу. Але середній розмір острівців збільшився недостовірно, їхній розмір варіював від дрібних до середніх (до 7800 мкм2). Тобто, поява нових острівців малого розміру нівелює значне збільшення острівців, що вижили після введення алоксану. Прискорення проліферації клітин призвело до збільшення питомого об’єму острівкової тканини в 1,8 (p<0,05) і 2,5 рази (p<0,001) відповідно на 45 і 70 доби. По-друге, середня кількість ІСК збільшилася в 1,5 (p<0,05) на 45 добу і в 1,7 рази (p<0,001) на 70 добу у порівнянні із тваринами 1 групи. Але аналіз відносного складу острівців виявив недовершеність їх складу. Питома частка інсулін-позитивних клітин в острівці була вкрай низька – лише 32,4±5,5% на 45 добу та 46,1±7,8% на 70 добу, тобто вона була меншою в 1,4 рази на 45 добу (p<0,05) і в 1,3 рази (p<0,001) на 70 добу експерименту ніж у тварин 1 групи. Питома частка глюкагон-позитивних клітин була високою. Прискорення регенерації острівкової тканини відобразилося у підвищенні рівня інсуліну крові і зменшенні гіперглікемії. Через добу після введення культури спостерігали різке падіння рівня глюкози в 1,5 рази (p<0,001), що є проявом функціонування трансплантату, потім до 39 доби спостерігали деяке підвищення рівня глюкози через загибель трансплантованих клітин, а після 39 – його зниження за рахунок синтезу інсуліну бета-клітинами підшлункової залози реципієнта; на 70 добу експерименту рівень глюкози був в 1,5 рази (p<0,001) нижче, ніж у тварин без трансплантації, а рівень інсуліну – в 6 разів вище (p<0,001). Значне підвищення рівня інсуліну призвело і до поліпшення показників жирового обміну. Відзначено достовірне зниження рівня ТГ (в 1,9 рази, p<0,001), ЗХ (в 1,3 рази, p<0,001) і ІА (в 1,8 рази, p<0,01), недостовірне (p>0,05) зниження рівня холестерину ЛПНЩ і підвищення рівня холестерину ЛПВЩ в 1,1 рази у порівнянні із тваринами 1 групи. Зниження рівня гиперглікемії і зменшення дисліпідемії відобразилися в уповільненні розвитку мікроангіопатії. У порівнянні з 1 групою спостерігалося зменшення абсолютної товщини стінок прекапілярних артеріол в 1,3 рази (p>0,05), артеріол були в 1,2 рази (p<0,05), дрібних артерій – в 1,1 рази (p<0,001); відносної товщини – в 1,1 рази (p>0,05), в 1,2 рази (p<0,001), в 1,2 рази (p<0,001), відповідно.

Одержані дані свідчать про те, що однократна трансплантація культури клітин підшлункової залози призводить до значного прискорення проліферації клітин в острівцях, що існували до трансплантації, і появи нових острівців, що у підсумку призводять до збільшення питомого об’єму острівкової тканини і кількості ІСК. Але склад острівкових клітин не є довершеним через малий процент бета-клітин. Відчутне прискорення синтезу інсуліну веде до зниження гіперглікемії і дисліпідемії, до гальмування розвитку мікроангіопатії, але жоден із вивчених показників не відповідає показникам інтактних щурів.

Після дворазової трансплантації культури острівкових клітин ПШЗ (група 2Б) спостерігали як збільшення кількості острівців на одиницю площі в 2,1 рази (p<0,05) на 45 добу і в 2,0 рази (p<0,001) на 70 добу у порівнянні із тваринами без трансплантації, так і різке збільшення їхнього середнього розміру. Так, середній розмір острівців на 45 добу був в 1,3 рази (p<0,05), на 70 добу – в 1,5 рази (p<0,001) більше, ніж у тварин, яким трансплантацію не виконували. Зустрічалися як дрібні острівці, так і великі, на 70 добу експерименту деякі з них досягали площі 20000 мкм2 і містили більше 200 клітин. Вказані зміни призвели до значного росту питомого об’єму острівкової тканини – в 2,2 рази (p<0,05) на 45 добу і в 3,2 рази (p<0,001) на 70 добу, що було лише в 2,6 рази менше (p<0,001), ніж в інтактних тварин. Основою цих змін було прискорення проліферації клітин в острівцях – на 45 добу в 4,9 разів (p<0,05), на 70 добу – в 3,6 рази (p<0,001) у порівнянні з тваринами без лікування. Відносний склад клітин в острівці зазнає значних змін з 45 до 70 доби експерименту. На 45 добу середня кількість бета-клітин була в 1,3 рази (p<0,05) нижче ніж у тварин без трансплантації, але до 70 доби відбувалося різке збільшення частки бета-клітин до 71,7±2,4%, що в 1,3 рази (p<0,001) більше, ніж у тварин без лікування, і лише в 1,1 рази менше (p<0,001), ніж у інтактних тварин. Результатом цих змін було значне підвищення ІСК у залозі. Збільшення кількості ІСК на одиницю площі на 45 добу в 1,8 рази (p<0,05) та в 4,1 рази (p<0,001) на 70 добу відобразилося у рості рівня інсуліну на 70 добу у 11 разів (p<0,001) у порівнянні із тваринами 1 групи, а рівень глюкози впав в 1,6 рази (p<0,001). Значне поліпшення вуглеводного обміну привело і до поліпшення жирового обміну. При порівнянні із тваринами 1 групи встановлені достовірно менші рівні ТГ (в 2,0 рази, p<0,001), ЗХ (в 1,3 рази, p<0,001), холестерину ЛПНЩ (в 1,3 рази, p<0,01) і ІА (в 2,2 рази, p<0,001). Рівень холестерину ЛПВЩ був вищим в 1,4 рази (p<0,05) ніж у тварин 1 групи та не мав достовірних відмінностей від рівня інтактних тварин. Зменшення гіперглікемії і дисліпідемії призвело до відчутного гальмування розвитку діабе­тич­ної мікроангіопатії. Встановлено, що середня товщина стінки прекапілярних артеріол була в 1,6 рази менше (p<0,05), ніж у тварин без трансплантації, а відносна товщина стінки – в 1,3 рази менше (p<0,01). Середня і відносна товщина стінки артеріол були в 1,3 (p<0,01) і 1,2 рази (p<0,001) менше, середня й відносна товщина стінки дрібних артерій – в 1,3 і 1,2 рази (p<0,001) менше у порівнянні із тваринами 1 групи.

Отримані дані показують, що при дворазовому введенні культури клітин ПШЗ спостерігається виразне прискорення проліферації клітин, хоча кількість острівців залишається такою самою, як і після однократного введення, проте розміри деяких острівців набагато збільшуються. Тому питомий об'єм острівкової тканини і кількість ІСК стають значно більшими. Відсоток бета-клітини в острівці також зростає. Регенерація клітин у ПШЗ призводить до різкого зростання синтезу інсуліну, і, відповідно, зниженню рівня гіперглікемії, виразності дисліпідемії і різкому гальмуванню розвитку мікроангіопатії. Збільшення кількості бета-клітин відбувається, скоріше за все, за рахунок прискорення ділення диференційованих клітин, тобто за рахунок прискорення відновлення клітин за механізмом, подібним до фізіологічної регенерації. Підтверд­женням цього припущення є результати потрійного імунофлуорес­центного забарвлення: на 45 і на 70 доби експерименту у тварин 2Б групи наявною є проліферація інсулін-позитивних клітин.

За результатами дослідження встановлено, що навіть введення зруйнованої шляхом двократного циклу замороження-розмороження культури острівкових клітин ПШЗ (3 група тварин) викликає невелике, однак статистично достовірне, збільшення проліферації клітин у ПШЗ (в 2,2 рази (p<0,001) на 70 добу у порівнянні із 1 групою), зростання питомого об’єму острівкової тканини (в 1,6 рази, p<0,001) і кількості ІСК на одиницю площі залози (в 1,2 рази, p<0,05) за рахунок появи дрібних острівців, що призвело до зменшення середньої площі острівців в 1,3 рази (p<0,05) при далекому від оптимального складі острівкових клітин – на 70 добу питомий об'єм бета-клітин зменшився в 1,2 рази (p<0,01) у порівнянні із тваринами 1 групи. Ці зміни призводять до зменшення рівня глюкози в 1,3 рази (p<0,05) і підвищення рівня інсуліну в 3,5 рази (p<0,001) у порівнянні із тваринами без трансплантації. Також зменшилися вираженість дисліпідемії та уповільнився розвиток діабетичної мікроангіопатії.

При введенні культури гемопоетичних стовбурових клітин (4 група) спостерігалося різке збільшення проліферації клітин в ендокринній частині залози в 9,9 разів (p<0,05) на 45 добу і в 5,5 разів (p<0,001) на 70 добу у порівнянні із тваринами 1 групи. Кількість острівців на одиницю площі на 45 і 70 добу збільшується у 2,1 (p<0,05) і 2,3 (p<0,001) рази у порівнянні із тваринами 1 групи, але статистично не відрізняється від інших груп. Така висока проліферативна активність у поєднанні з неогенезом острівців призвела до збільшення питомого об’єму острівкової тканини в 3,1 рази (p<0,05) на 45 добу і в 5,0 разів (p<0,001) на 70 добу у порівнянні із тваринами 1 групи. Також зросла й середня площа острівця: на 45 добу вона була в 1,1 рази (p<0,05) більше, на 70 добу – в 2,3 рази (p<0,001) більше у порівнянні з 1 групою, при цьому зустрічалися гігантські острівці із площею до 37000 мкм2. Питомий об’єм бета-клітин на 45 добу був найнижчим серед усіх груп, від складав 22,1±2,6% при найбільшій кількості ані альфа-, ані бета-клітин – 46,09±3,32%. Але на 70 добу питомий об’єм бета-клітин був достовірно (p<0,001) найвищим (77,6±1,7%) серед всіх груп, а питомий об’єм альфа-клітин – достовірно найнижчим (співвідношення бета- до альфа-клітин дорівнювало 4,0), при цьому кількість інших (ні альфа-, ні бета-) клітин залишалася досить високою (2,93±1,17%), але значно нижчою, ніж у тварин 1 групи. Ці зміни призвели до зростання середньої кількості інсулін-позитивних клітин на одиницю площі в 3,0 рази (p<0,05) на 45 добу і в 6,2 рази (p<0,001) на 70 добу у порівнянні із 1 групою. У той же час підвищення рівня інсуліну на 70 добу склало 16 разів (p<0,001), що призвело до зниження рівня глюкози до 5,82±0,80 ммоль/л, що в 1,7 рази (p<0,001) менше ніж у тварин 1 групи і в 1,4 рази (p<0,001) вище ніж у інтактних тварин. Такі зміни призвели до поліпшення показників дисліпідемії. Відмінності від групи тварин без трансплантації на 70 добу експерименту були значними й достовірними. Так рівень ТГ був в 2,4 рази нижче (p<0,001), ЗХ – в 1,5 рази нижче (p<0,001), холестерину ЛПНЩ – в 2,3 рази нижче (p<0,001), холестерину ЛПВЩ – в 1,4 рази вище (p<0,01), ІА – в 3,2 рази нижче (p<0,001). У порівнянні із інтактними тваринами рівень холестерину ЛПНЩ був лише в 1,2 рази (p<0,05) вище, ІА – в 1,3 рази (p<0,01), у той же час рівні ТГ, ЗХ і холестерину ЛПВЩ достовірно не відрізнялися (p<0,05). Зниження рівня глюкози і ступеня порушень обміну жирів відбилося у практично повному призупиненні розвитку мікроангіопатії. На 70 добу експерименту у порівнянні із тваринами, що не одержували лікування, середня товщина стінки прекапілярних артеріол була в 1,6 рази менше (p<0,01), а відносна товщина – в 1,4 рази менше (p<0,001), середня й відносна товщина стінки артеріол були в 1,4 і 1,3 рази менше (p<0,001 для обох показників), середня і відносна товщина стінки дрібних артерій виявилися в 1,5 рази менше (p<0,001 для обох показників). У порівнянні з даними на 30 добу (перед трансплантацією) усі показники були нижчими, достовірно тільки абсолютна товщина артеріол була нижчою. Тобто, трансплантація стовбурових тканини повністю призупиняє розвиток мікроангіопатії, принаймні у строки нашого дослідження.

Таким чином, після трансплантації культури стовбурових клітин спостерігалось різке прискорення проліферації острівкових клітин. При цьому кількість бета-клітин на 45 добу була найнижчою серед усіх груп при найбільшій кількості ані альфа-, ані бета-клітин. Це можна пояснити тим, що у даний термін відбувається 1 етап регенерації – проліферація клітин. Найбільш наочно цей феномен був висвітленим після потрійного імунозабарвлення: на 45 добу більшість клітин, що проліферують, не експресують інсуліну у цитоплазмі. Але до 70 доби етап проліферації змінюється на етап диферен­ціювання: при потрійному імунозабарвленні є наявним, що більшість клітин, що проліферують, є інсулін-позитивними.. Отже, трансплантація культури клітин ПШЗ призводить до прискорення регенерації острівкових клітин за механізмом, що є подібним до репаративної регенерації і складається із 2 етапів – проліферації і диференціювання.

ВИСНОВКИ

У дисертаційний роботі проведено теоретичне узагальнення та експериментальне вирішення наукової проблеми встановлення впливу трансплантації культур острівкових клітин підшлункової залози і гемопоетичних стовбурових клітин на перебіг експериментального цукрового діабету у щурів із визначенням змін у вуглеводному, ліпідному обміні, у морфологічному стані підшлункової залози та артеріальних судин.

1. Внутрішньочеревна трансплантація культури алогенних гемопоетичних стовбурових клітин, трансплантація живої культури ксеногенних клітин підшлункової залози і зруйнованої культури ксеногенних клітин підшлункової залози щурам із експериментальним цукровим діабетом призводять до поліпшення всіх досліджених показників перебігу цукрового діабету. Найбільш ефективними методами на 70 добу експерименту були одноразова трансплантація культури гемопоетичних стовбурових клітин і дворазова трансплантація живої культури клітин підшлункової залози.
2. На 40 добу після дворазової трансплантації культури клітин підшлункової залози і трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин рівень інсуліну крові зростає в 11 разів і 16 разів, відповідно, а рівень глікемії знижується відповідно в 1,6 рази і 1,7 рази, але він залишається в обох групах в 1,4 рази більше, ніж у інтактних тварин.
3. Після дворазової трансплантації живої культури клітин підшлункової залози і трансплантації культури гемопоетичних стовбурових клітин на 40 добу у порівнянні із тваринами з експериментальним цукровим діабетом, яким трансплантацію не виконували, спостерігається збільшення питомого об’єму острівкової тканини в 3,2 рази і 5,0 разів, відповідно, а збільшення кількості клітин, що синтезують інсулін, на одиницю площі залози склало 4,1 і 6,2 разів відповідно.
4. В умовах експериментального цукрового діабету деякі ацинарні екзокринні клітини та клітини проток підшлункової залози набувають здатність до синтезу інсуліну. На 30 добу алоксанового діабету середня кількість кластерів клітин, що формуються із ацинарних екзокринних клітин, які набули здатність синтезувати інсулін, на 10 мм2 зрізу склала 2,96±0,59, а середня кількість клітин у кластері дорівнювала 4,42±0,51. У групі інтактних тварин такі кластери знайдені не були. Після трансплантації клітинних культур середня кількість таких кластерів на одиницю площі залози достовірно не відрізнялась від тварин без трансплантації.
5. Після дворазової трансплантації культури клітин підшлункової залози і трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин рівень тригліцеридів змен­шується відповідно в 2,0 рази і 2,4 рази, загального холестерину – в 1,3 рази і 1,5 рази, холестерину ЛПНЩ – в 1,3 рази і 2,3 рази, індексу атерогенності – в 2,2 рази і 3,2 рази, а рівень холестерину ЛПВЩ збільшується в обох групах в 1,4 рази у порівнянні із тваринами з цукровим діабетом, яким трансплантацію не виконували. Трансплантація культури стовбурових клітин призводить до найбільш вираженої корекції дисліпідемії. Після виконання цього виду трансплантації рівні тригліцеридів, загального холестерину і холестерину ЛПВЩ достовірно не відрізняються від рівня інтактних тварин.
6. Трансплантації усіх використаних видів клітинних культур гальмують розвиток діабетичної мікроангіопатії. Наприкінці експерименту у тварин з дворазовою трансплантацією культури клітин підшлункової залози і гемопоетичних стовбурових клітин відносна товщина стінки прекапілярних артеріол серця була в 1,3 рази і 1,4 рази менше, стінки артеріол – в 1,2 рази і 1,3 рази менше, дрібних артерій – в 1,2 рази і 1,5 разів менше, відповідно, ніж у тварин без трансплантації. Введення клітин підшлункової залози призвело до неповного гальмування розвитку мікроангіопатії. Після дворазової трансплантації абсолютна і відносна товщина дрібних артерій і відносна товщина артеріол залишились більшими в 1,1 рази, ніж перед трансплантацією на 30 добу, інші показники достовірно не збільшились. Трансплантація культури стовбурових гемопоетичних клітин призводить до повного зупинення розвитку мікроангіопатії, усі показники достовірно не збільшились у порівнянні з даними на 30 добу, а абсолютна товщина стінки артеріол зменшилась в 1,2 рази.
7. Одержані результати є експериментальним обґрунтовуванням доцільності застосування трансплантації культур клітин підшлункової залози і стовбурових гемопоетичних клітин для корекції перебігу інсулін-залежного цукрового діабету.

**СПИСОК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. Єльський В.М., Селезньова О.В., Зінкович І.І., Федорова А.О. Вплив трансплантації клітинних культур на виразність діабетичної дисліпідемії // Ендокринологія.–2006.–Т.11, №2.–С.175-180. (Здобувачка вивчила зміни показників ліпідного обміну. Спільно з співавторами виконано обговорення результатів і формулювання висновків).
2. Єльський В.М., Селезньова О.В., Зінкович І.І. Вплив трансплантації клітинних культур на вираженість діабетичної мікроангіопатії в експерименті // Клін. експерим. патологія.–2007.–Т.6, №1.–С.40-46. (Здобувачкою проведено морфометричний аналіз товщини стінок судин, обробка результатів. Спільно з співавторами виконано обговорення результатів і формулювання висновків).
3. Єльський В.М., Зінкович І.І., Селезньова О.В. Вплив трансплантації клітинних культур на основні показники вуглеводного обміну при експериментальному цукровому діабеті // Ендокринологія.–2007.–Т.12, №2.–С.276-286. (Здобувачка вивчила зміни показників вуглеводного обміну. Спільно з співавторами виконано обговорення результатів і формулювання висновків).
4. Єльський В.М., Селезньова О.В. Динаміка морфологічних змін у підшлунковій залозі тварин з експериментальним цукровим діабетом після трансплантації клітинних культур // Загальна патологія та патологічна фізіологія.–2007.–Т.2, №2.–С.72-75. (Здобувачкою виконано морфометричний аналіз підшлункової залози, обробка результатів і їх аналіз. Спільно з співавтором виконано обговорення результатів і формулювання висновків).
5. Єльський В.М., Селезньова О.В., Зінкович І.І. Вплив трансплантації клітинних культур на стан острівкового апарата пацюків з експериментальним цукровим діабетом // Патологія.–2006.–Т.3, №2.–С.43-49. (Здобувачкою виконано морфометричний аналіз підшлункової залози. Спільно з співавторами виконано обговорення результатів і формулювання висновків).
6. Селезнева Е.В. Современные представления о морфогенезе и регенерации островкового аппарата поджелудочной железы // Вестник неотложной и восстановительной медицины.–2005.–Т.6, №1.–С.151-154.
7. Селезнева Е.В., Зинкович И.И. Влияние трансплантации культуры островковых клеток поджелудочной железы на течение экспериментального сахарного диабета у крыс // Мат. конф. «Гомеостаз: физиология, патология, фармакология и клиника».–2005.–Одеса.–С.206-209. (Здобувачкою виконано морфометричний аналіз підшлункової залози і стінок артеріальних судин серця. Спільно з співавтором виконано формулювання висновків).
8. Ельский В.Н., Зинкович И.И.., Селезнева Е.В. Состояние основных показателей жирового обмена у животных с экспериментальным сахарным диабетом после трансплантации культуры островковых клеток поджелудочной железы // Фізіол. журн.–2006.–Т.52, №2.–С.122. (Здобувачка вивчила зміни показників ліпідного обміну. Спільно з співавторами виконано формулювання висновків).
9. Селезнева Е.В. Влияние трансплантации стволовых клеток на регенерацию панкреатических островков // Проблемы, достижения и перспективы развития медико-биологических наук и практического здравоохранения.–2006.–Т.142, №3.–С.248.
10. Селезнева Е.В., Зинкович И.И. Эффект трансплантации культуры островковых клеток поджелудочной железы на течение экспериментального сахарного диабета // Мат. наук.-практ. конференції «IV читання ім.В.В.Підвисоцького».–2005.–Одеса.–С.88-89. (Здобувачка вивчила зміни показників вуглеводного і ліпідного обміну. Спільно з співавтором виконано формулювання висновків).
11. Селезнева Е.В. Связь биохимических и морфологических показа­те­лей после трансплантации культуры клеток поджелудочной железы у крыс с аллоксановым диабетом // Мат. IX Українського біохім. з’їзду.–2006.–Т.2.–С.146.
12. Зінкович І.І., Єльський В.М., Селезньова О.В. Ступінь корекції діабетичної дисліпідемії при експериментальному цукровому діабеті після трансплантації культур клітин підшлункової залози // Ендокринологія.–2007.–Т.12 (додаток).–С.80. (Здобувачка вивчила зміни показників ліпідного обміну. Спільно з співавторами виконано формулювання висновків).
13. Зінкович І.І., Селезньова О.В. Вплив трансплантації клітинних культур на розвиток діабетичної мікроангіопатії // «VI читання ім.В.В.Підвисоцького»: Бюлетень матеріалів наук. Конференції (31 травня – 1 червня 2007 р).–Одеса.–2007.–С.66-67. (Здобувачкою виконано морфо­метрич­ний аналіз товщини стінок судин. Спільно з співавтором виконано формулювання висновків).

**АНОТАЦІЇ**

Селезньова О.В. Вплив трансплантації культур клітин підшлункової залози і стовбурових клітин на патогенез експериментального цукрового діабету. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 14.03.04 – патологічна фізіологія. – Луганський державний медичний університет. – Луганськ, 2008.

Дисертаційна робота присвячена удосконаленню знань про вплив трансплантації культур клітин підшлункової залози й стовбурових гемопоетичних клітин на патогенез експериментального алоксанового цукрового діабету у щурів. Вивчені особливості вуглеводного, жирового обміну, морфологічних змін в ендокринній частині підшлункової залози, вираженості діабетичної мікроангіопатії після трансплантації. Встановлено, що внутрішньочеревна трансплантація цих культур призводить до поліпшення всіх досліджених показників: зниженню рівня гіперглікемії та дисліпідемії, підвищенню рівня інсуліну, гальмуванню розвитку мікроангіопатії. Основою цих змін є прискорення регенерації ендокринної тканини підшлункової залози, що відбивається зростанням питомого об’єму острівкової тканини і кількості клітин, що синтезують інсулін. Також показано, що механізми впливу є різними для вивчених культур. Отримані результати є експериментальним обґрунтовуванням доцільності застосування трансплантації зазначених культур клітин для корекції перебігу інсулін-залежного цукрового діабету.

Ключові слова: цукровий діабет, клітинні культури, стовбурові клітини, трансплантація, патогенез.

Селезнева Е.В. Влияние трансплантации культур клеток поджелудочной железы и стволовых клеток на патогенез экспериментального сахарного диабета. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.04 – патологическая физиология. – Луганский государственный медицинский университет. – Луганск, 2008.

Работа посвящена усовершенствованию знаний о влиянии трансплантации клеточных культур поджелудочной железы и стволовых гемопоэтических на патогенез экспериментального сахарного диабета. Изучены особенности углеводного, липидного обмена, морфологических изменений в эндокринной части поджелудочной железы, выраженность диабетической микроангиопатии после трансплантации.

Установлено, что трансплантация культуры аллогенных гемопоэти­ческих стволовых клеток и трансплантация ксеногенной клеточной культуры поджелудочной железы (живой и разрушенной) приводят к коррекции всех изученных показателей, отражающих тяжесть течения сахарного диабета. Наиболее эффективными на конец эксперимента оказались трансплантация культуры стволовых клеток и двукратная трансплантация живой культуры островковых клеток поджелудочной железы.

На 40 день после двукратной трансплантации культуры клеток поджелудочной железы и стволовых клеток уровень инсулина вырос в 11 и в 16 раз, соответственно, а уровень гипергликемии снизился в 1,6 раз і 1,7 раз, соответственно. По сравнению с группой без трансплантации наблюдалось увеличение удельного объема островковой ткани в 3,2 раза и в 5 раз, соответственно, а количество инсулин-продуцирующих клеток на единицу площади увеличилось в 4,1 раз и 6,2 раз, соответственно.

В условиях экспериментального сахарного диабета некоторые ацинарные экзокринные и протоковые клетки приобретают способность синтезировать инсулин. На 30 день аллоксанового диабета среднее количество кластеров, сформировавшихся из ацинарных экзокринных клеток, которые приобрели способность продуцировать инсулин, на 10 мм2 среза составило 2,96±0,59, а среднее количество клеток в кластере было 4,42±0,51. В группе интактных животных такие кластеры отсутствовали. После трансплантации клеточных культур среднее количество таких кластеров на единицу площади железы достоверно не отличалось от такового у животных без трансплантации.

После двукратной трансплантации культуры клеток поджелудочной железы и однократной стволовых гемоэтических клеток уровень триглицеридов снизился соответственно в 2,0 раза и 2,4 раза, общего холестерина – в 1,3 раза и 1,5 раза, холестерина ЛПНЩ – в 1,3 раза и 2,3 раза, индекс атерогенности – в 2,2 раза и 3,2 раза, а уровень холестерина ЛПВЩ в обоих группах вырос в 1,4 раза по сравнению с животными без трансплантации. Трансплантация культуры стволовых клеток приводит к наиболее выраженной коррекции дислипидемии. В результате данного вида трансплантации уровень триглицеридов, общего холестерина и холестерина ЛПВЩ достоверно не отличались от показателей интактных животных.

Трансплантации всех видов клеточных культур приостанавливают развитие диабетической микроангиопатии. В конце эксперимента после двукратной трансплантации культуры клеток поджелудочной железы и стволовых гемопоэтических клеток относительная толщина стенки: прекапилярных артериол сердца была в 1,3 раза и 1,4 раза меньше, артериол – в 1,2 раза і 1,3 раза меньше, мелких артерий – в 1,2 раза и 1,5 раз меньше, соответственно, чем у животных без трансплантации. Введение клеточной культуры поджелудочной железы привело к значительной приостановке развития микроангиопатии. После двукратной трансплантации только абсолютная и относительная толщина мелких артерий и относительная толщина артериол были в 1,1 раз больше по сравнению с данными перед трансплантацией, остальные показатели достоверно не увеличились. Трансплантация культуры стволовых гемопоэтических клеток приводит к полной остановке развития микроангиопатии, все показатели достоверно не увеличились по сравнению с данными перед трансплантацией, а абсолютная толщина стенки артериол уменьшилась в 1,2 раз.

Полученные результаты являются экспериментальным обоснованием целесообразности применения трансплантации культур клеток поджелудочной железы и стволовых гемопоэтических для коррекции течения инсулин-зависимого сахарного диабета.

Ключевые слова: сахарный диабет, клеточные культуры, стволовые клетки, трансплантация, патогенез.

Seleznyova O.V. Influence of pancreatic islet and stem cell cultures’ transplan­tation on pathogenesis of experimental diabetes mellitus. – Manuscript.

Thesis for a candidate degree of biological sciences on speciality 14.03.04 – pathological physiology. – Lugansk State Medical University. – Lugansk, 2008.

The thesis is devoted to evaluation of an influence of pancreatic islet and stem cell cultures’ transplantation on pathogenesis of an experimental diabetes mellitus in rats. It was found peculiarities of carbohydrates and lipids metabolism, changes in morphology of endocrine part of pancreas and diabetic microangiopathy severity after cell transplantation. It’s stated that intraperitoneal transplantation of mentioned cultures’ leads to improving of all investigated data: decreasing of hyperglycemia and dislipidemia, increasing of insulin level, inhibiting of microangiopathy progress. The basis of these changes is acceleration of endocrine pancreas tissue regeneration that appears as elevation of specific volume of islet tissue and number of insulin-producing cells. It was shown that mechanisms of investigated cell cultures influence are different. The obtained results are experimental foundation for usage of cell cultures’ transplan­tation for treatment of insulin-dependent diabetes mellitus.

Key words: diabetes mellitus, cell culture, stem cells, transplantation, pathogenesis.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ВООЗ – Всесвітня Організація Охорони Здоров’я

ГЛЮТ – глюкозний транспортер

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ЗХ – загальний холестерин

ІА – індекс атерогенності

ІЗЦД – інсулінозалежний цукровий діабет

ІНЦД – інсулінонезалежний цукровий діабет

ІСК – клітини, що синтезують інсулін

ЛПВЩ – ліпопротеїди високої щільності

ЛПДНЩ – ліпопротеїди дуже низької щільності

ЛПНЩ – ліпопротеїди низької щільності

ЛФ – лужна фосфатаза

мРНК – матрична рибонуклеїнова кислота

ПШЗ – підшлункова залоза

ТГ – тригліцериди

ЦД – цукровий діабет

ЦК – цитокератин

DAPI – 4',6-діаміно-2-феніліндолдігідрохлорід

FITC – флуоресцину ізотіоціанат

PCNA – ядерний антиген клітин, що проліферують

PE – фікоеритрин

## Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>