

Summary. Somatotrophic hormone (STH) biosynthesis and secretion were studied in primary adenohipophyseal cultures of neonatal, prepubertal, and adult rats. It was shown by disc PAAG electrophoresis of products synthesized in incubation of neonatal rat hypophyseal cells that L-¹⁴C leucin incorporates predominantly in the STH containing fraction. The share of prelabeled STH secreted into the culture virtually did not depend on the age of animals, this indicating the maturity of

mechanisms of basal somatotroph secretion as early as in the neonatal period of development. Ca-regulating agents (ionophore A23187, EGTA) caused quantitatively similar changes of somatotroph secretory activity in cultures of hypophyseal cells from rats of different ages. At the same time, clear-cut age-specific features of stimulating effect of dibutylryl derivatives of cAMP and cGMP on secretion of immunoreactive STH were detected. The results indicate that somatotrophic function in neonatal hypophysis is a dominant one and demonstrates increased reactivity to secretogenic action of cyclic nucleotide analogs.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ 1994

УДК 616.379-008.64-092.9-089:616.379-089.843]:615.874.2.03

Р. Е. Садыкова, Н. Н. Скалецкий, А. В. Древаль, Л. А. Кирсанова, П. И. Шишко

ВЛИЯНИЕ КСЕНОТРАНСПЛАНТАЦИИ КУЛЬТУР ОСТРОВКОВЫХ КЛЕТОК НА ТЕЧЕНИЕ АЛЛОКСАНОВОГО ДИАБЕТА У КРЫС, НАХОДИВШИХСЯ НА ДИЕТЕ С РАЗНЫМ СОДЕРЖАНИЕМ БЕЛКА

Институт питания РАМН, НИИ трансплантологии и искусственных органов Минздравмедпрома РФ, Москва

В последние годы значительно возрос интерес к использованию в лечении инсулинзависимого сахарного диабета трансплантации островковых клеток (ОК) поджелудочной железы [5—7]. Согласно одной из последних сводок Регистра трансплантаций островков поджелудочной железы [5], в мире выполнено около 1700 клинических трансплантаций островков и культур ОК. Основные результаты трансплантации ОК заключаются в стабилизации лабильных форм инсулинзависимого сахарного диабета, приостановлении прогрессирования и частичном регрессе его поздних осложнений, снижении потребности реципиентов в экзогенном инсулине вплоть до достижения в отдельных случаях временной инсулиннезависимости [3—5, 8, 9]. Поиски путей улучшения результатов клинической трансплантации ОК явились стимулом для проведения новых экспериментов по трансплантации ОК лабораторным животным. Ранее нами было показано [1], что рацион с высоким содержанием белка уменьшает тяжесть течения аллоксанового диабета у крыс. Основной целью настоящего исследования явилось изучение влияния ксенотрансплантации культур ОК на течение экспериментального сахарного диабета у крыс, находившихся на пищевом рационе с разным содержанием белка.

Материалы и методы

Эксперименты проведены на 60 крысах-самцах линии Вистар с исходной массой 100—120 г. После короткого адаптационного периода пребывания на общевиварном рационе 60 животным с массой тела не менее 160 г вводили подкожно аллоксан (фирма «Lachema») в дозе 200 мг/кг с целью индукции сахарного диабета. После этого крыс разделили на 3 равные группы (по 20 животных в каждой) и перевели на синтетический низкокалорийный рацион с нормальным — 18 % (1-я группа), пониженным — 9 % (2-я группа) и повышенным — 50 % (3-я группа) содержанием белка (соевый изолят Ардекс М). При этом изокалорийность пищевого рациона крыс 2-й группы обеспечивали путем повышения квоты жиров при сохранении квоты углеводов, у крыс 3-й группы — за счет уменьшения квоты как жиров, так и углеводов. Содержание смеси минеральных веществ (0,9 г/сут), смеси водорастворимых витаминов (0,2 г/сут), холинхлорида (0,04 г/сут), витаминов А (300 МЕ/сут) и D (20 МЕ/сут) во всех рационах было одинаковым.

С целью регистрации возникновения диабетического статуса и его изменения у крыс еженедельно определяли концентрацию глюкозы в крови с помощью глюкозооксидазного метода (набор фирмы «Reanal»).

Через 2 нед после введения аллоксана и начала диетического кормления 18 животным с гипергликемией более 16 ммоль/л (по 6 крыс из каждой группы) произвели ксенотрансплантацию культур ОК. Культуры получали из поджелудочных желез новорожденных кроликов по методике, включающей в основном ферментное переваривание панкреатической ткани 0,2 % раствором коллагитина и измельчение ее глазными ножницами с последующей инкубацией по-

Изменения гликемии у крыс, находившихся на рационе с разным содержанием белка, после индукции аллоксанового диабета и последующей ксенотрансплантации культур ОК и у крыс с нелеченым аллоксановым диабетом (контроль; $M \pm m$)

Группа животных	Концентрация глюкозы в крови, ммоль/л		
	через 1 нед после введения аллоксана	через 2 нед после введения аллоксана	через 2 нед после трансплантации
1-я:			
реципиенты	26,0±2,8*	23,5±5,0*	16,4±1,4**
контроль	19,8±1,9	18,2±2,0	18,4±2,2
2-я:			
реципиенты	19,7±3,9	20,4±2,4	15,0±3,1***
контроль	17,8±2,4	19,1±1,4	18,6±2,8
3-я:			
реципиенты	26,8±3,8*	20,3±3,5	12,0±2,6***
контроль	21,0±1,6	17,1±1,9	16,6±2,0

Различия между реципиентами и контролем в каждой группе животных $p^* < 0,05$.

Достоверность показателей через 1 неделю после введения аллоксана и через 2 недели после трансплантации $p^{**} < 0,05$.

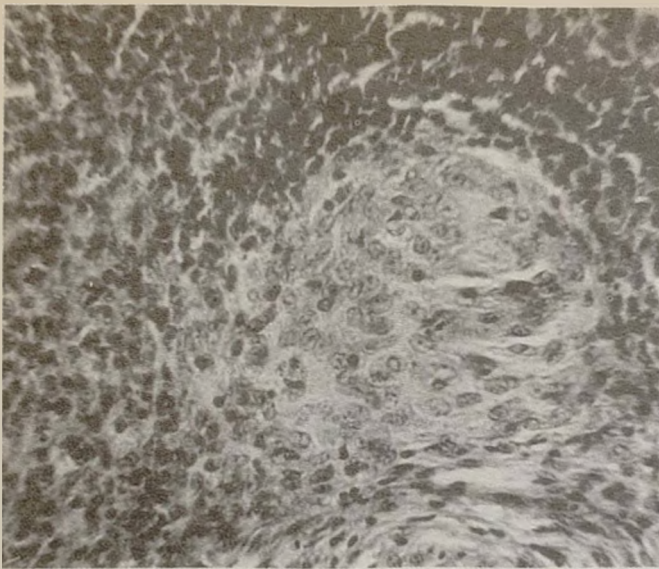


Рис. 1. Гистологическая картина селезенки с имплантированными ОК поджелудочной железы. Отсутствие лимфоцитарной инфильтрации трансплантата, определяются неповрежденные островковые культуры. Здесь и на рис. 2—3. Окраска гематоксилин-эозином. $\times 150$.

лученных микрофрагментов в среде 199 с 10 % эмбриональной телячьей сыворотки последовательно при 37 °C в течение 3 сут и при 24 °C в течение 7 сут. Культуры, выращенные в стеклянных матрицах, собирали непосредственно перед трансплантацией и в виде суспензии в растворе Хенкса вводили крысам-реципиентам в пульпу селезенки шприцем через инъекционную иглу. Через 2 нед после трансплантации животных забивали и проводили гистологическое исследование селезенки с имплантированными ОК и поджелудочной железы крыс-реципиентов. С этой целью кусочки органов фиксировали в смеси Буэна, заливали в парафин. Срезы толщиной 5—7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, а также альдегид-фуксином для выявления β -клеток. Одновременно исследовали поджелудочную железу контрольных крыс с нелеченым аллоксановым диабетом, а также здоровых крыс, которым не вводили аллоксан.

Результаты и их обсуждение

В течение 2—3 сут после введения аллоксана у большинства животных развивались типичные признаки диабетического статуса — полиурия, полидипсия, снижение массы тела, выпадение шерсти, гиподинамия. К исходу первой недели после индукции аллоксанового диабета умерли 11 животных — 2 из 3-й, 3 из 1-й и 6 из 2-й группы. Из оставшихся в живых 14 животных 2-й группы у 10 уровень гликемии превышал 16 ммоль/л. 6 из них с наиболее высоким уровнем гликемии (см. таблицу) была произведена внутриселезеночная трансплантация культур ОК, а 4 крысы составили контрольную подгруппу животных с нелеченым аллоксановым диабетом. Животные 1-й и 3-й групп были аналогичным образом поделены на подгруппы реципиентов и контрольную (по 6 животных в подгруппе — см. таблицу). Существенно более низкий уровень глюкозы в крови у животных 2-й группы был обусловлен скорее всего тем, что в течение первой недели после инъекции аллоксана погибли крысы с наиболее высокой концентрацией глюкозы в крови.

Через 2 нед после введения аллоксана уровень глюкозы в крови животных 1-й и 2-й групп существенно не изменился, в то время как у крыс 3-й

группы он снизился более значительно (см. таблицу). Это можно объяснить, учитывая полученные нами ранее данные [1], благоприятным действием рациона с повышенным содержанием белка на течение экспериментального (аллоксанового) сахарного диабета.

После внутриселезеночной ксенотрансплантации культур ОК выраженное снижение концентрации глюкозы в крови отмечалось во всех 3 группах крыс-реципиентов (см. таблицу). В то же время в контрольных подгруппах крыс, находившихся на разных по содержанию белка рационах, но не подвергшихся трансплантации культур ОК, уровень глюкозы существенно не изменялся на протяжении всего наблюдения, за исключением животных, находившихся на рационе с 50 % белка. Это еще раз подтверждает уменьшение тяжести диабетического статуса у животных, находящихся на пищевом рационе с повышенным количеством белка.

При гистологическом исследовании селезенки с имплантированными культурами ОК удалось выявить неповрежденные ОК в 1-й группе крыс-реципиентов у 4 из 6, во 2-й группе у 2 из 6, в 3-й у всех животных. Признаков лимфоцитарной инфильтрации трансплантата обнаружено не было (рис. 1).

В поджелудочной железе здоровых интактных крыс выявлено в островках Лангерганса, как и ожидалось, от 45 до 76 % β -клеток. У крыс с нелеченым аллоксановым диабетом содержание β -клеток в сохранившихся островках поджелудочной железы оказалось резко сниженным, однако степень снижения, по-видимому, зависела от содержания белка в пищевом рационе. Так, если у нелеченых животных 1-й и 3-й групп доля β -клеток в островке составила в среднем соответственно 6,2 и 8,3 %, то во 2-й группе островки с хотя бы единичными β -клетками были обнаружены лишь у 1 из 4 крыс (рис. 2). Существенно более высокое содержание β -клеток в островках было выявлено у крыс-реципиентов

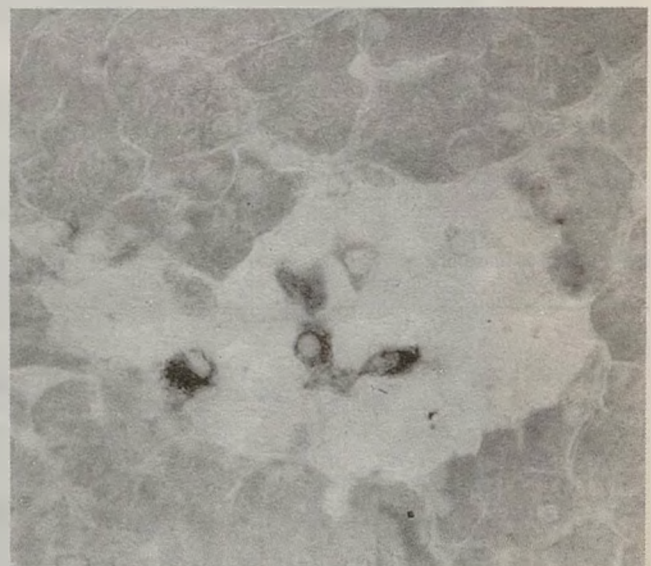


Рис. 2. Поджелудочная железа крыс с аллоксановым диабетом, получавших низкое содержание белка в рационе (9 %). Островки Лангерганса небольшого размера, количество β -клеток — 3—5.

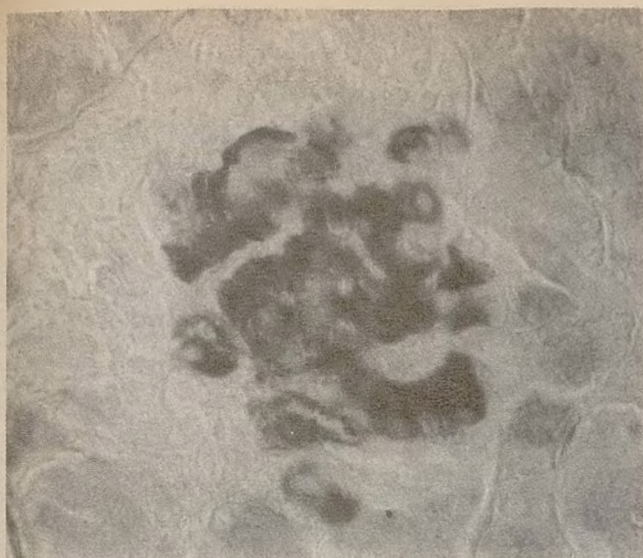


Рис. 3. Поджелудочная железа крыс с аллоксановым диабетом, получавших высокое содержание белка в рационе (50 %). Размер островков Лангерганса не изменен, количество α - и β -клеток приближено к контрольному.

(рис. 3). Так, у 3 из 6 животных 1-й группы, подвергнутых внутриселезеночной ксенотрансплантации культур ОК, в собственной поджелудочной железе были выявлены характерные β -клетки, причем доля их среди островковых клеток составила от 7 до 21 % (в среднем 13 ± 2 %). У 3 из 6 крыс-реципиентов 2-й группы в поджелудочной железе также обнаружены островки с содержанием β -клеток от 7 до 17 % (в среднем 12 ± 1 %), т. е. почти столько же, сколько в островках поджелудочной железы у животных 1-й группы. Среди крыс-реципиентов 3-й группы островки с нормальными β -клетками были выявлены у 4 из 6, причем доля β -клеток составила уже от 10 до 55 % (в среднем 23 ± 8 %). Таким образом, наибольший пул β -клеток был выявлен в поджелудочной железе крыс-реципиентов, получавших рацион с повышенным содержанием белка.

Основываясь на результатах настоящей работы, а также на данных предыдущих исследований [2], можно полагать, что антидиабетическое действие ксенотрансплантации культур островковых клеток на течение аллоксанового диабета у крыс осуществлялось двумя основными путями: а — функционирование имплантированных β -клеток, подтвержденное, помимо быстрого сахароснижающего эффекта пересадки, выявлением трансплантатов ОК в пульпе селезенки крыс-реципиентов; б — стимулирующее действие трансплантации культур ОК на островковый аппарат поджелудочной железы крыс-реципиентов с аллоксановым диабетом, о возможности которого говорят данные гистологического исследования, выявившие существенно большую частоту нахож-

дения островков с нормальными β -клетками и большую долю последних в островках поджелудочной железы у крыс-реципиентов, чем у крыс с нелеченым аллоксановым диабетом. Дальнейшие экспериментальные исследования с целью подтверждения стимулирующего действия трансплантации ОК и раскрытия его механизма могут существенно уточнить показания к этому методу лечения инсулинзависимого сахарного диабета.

Выводы

1. Гипогликемизирующий эффект ксенотрансплантации культур островковых клеток более выражен у крыс с аллоксановым диабетом, получавших рацион с нормальным и повышенным содержанием белка.

2. Трансплантация культур островковых клеток, по-видимому, оказывает стимулирующее действие на процессы регенерации в островках поджелудочной железы крыс-реципиентов, выражающееся в частичном восстановлении количества β -клеток. Стимулирующий эффект более заметен у крыс, находившихся на пищевом рационе с повышенным (50 %) содержанием белка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Древалъ А. В., Садыкова Р. Е., Мазо В. К. // Пробл. эндокринологии. — 1991. — № 6. — С. 56—58.
2. Скалецкий Н. Н. Ксенотрансплантация культур островковых клеток поджелудочной железы плодов человека крысам с экспериментальным сахарным диабетом: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 1987.
3. Словеснова Т. А., Глухоев С. В., Игнатенко С. Н. и др. // Пробл. эндокринологии. — 1989. — № 1. — С. 25—28.
4. Шумаков В. И., Блюмкин В. Н., Игнатенко С. Н. и др. // Там же. — 1985. — № 5. — С. 67—70.
5. Federlin K., Bretzel R. G., Hering B. J. // Diabet. Med. — 1991. — N 8. — P. 5—12.
6. Gray D. R. W. // Immunol. Lett. — 1991. — Vol. 29. — P. 153—156.
7. Pipelleers D. // Science. — 1991. — Vol. 7, N 4. — P. 346—355.
8. Scharp D. W., Lacy P. E., Santiago J. V. et al. // Transplantation. — 1991. — Vol. 51, N 1. — P. 76—85.
9. Tzakis A. G., Ricordi C., Alejandro R. et al. // Lancet. — 1990. — Vol. 18. — P. 402—406.

Поступила 28.05.92

R. Ye. Sadykova, N. N. Skaletsky, A. V. Dreval, L. A. Kirsanova, P. I. Shishko — EFFECT OF ISLET CELL CULTURE XENOTRANSPLANTATION ON ALLOXAN DIABETES COURSE IN RATS FED DIETS WITH DIFFERENT PROTEIN CONTENT

The authors present data on the protective effect of newborn rabbits pancreatic islet cell culture xenotransplantation of Langerhans' islets β -cells of rats with alloxan diabetes. This effect was the most marked in rats fed diets with normal or increased protein content. The authors discuss a possible stimulating effect of rabbit islet cell culture xenotransplantation on regeneration processes in recipient rat pancreatic islets. This effect was better pronounced in rats kept on rations with increased protein content. Further experiments will help more accurately define the indications for therapy of insulin-dependent diabetes mellitus by xenotransplantations of islet cell cultures.