

На правах рукописи

Чубик Максим Петрович

Морфофункциональное состояние тканевых базофилов
при сахарном диабете на фоне имплантации островковых клеток
поджелудочной железы

03.00.25 - гистология, цитология, клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Томск – 2002

Работа выполнена в Сибирском государственном медицинском университете

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор Красноженов Е.П.

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор Козлов Ю.А.

кандидат медицинских наук Васильев Н.В.

Ведущая организация – Новосибирская государственная медицинская академия

Защита состоится «11» октября 2002 г. в 10 ч. на заседании диссертационного совета Д 208.096.03. в Сибирском государственном медицинском университете (634050, г. Томск, Московский тракт, 2)

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке Сибирского государственного медицинского университета (г.Томск, пр. Ленина, 107)

Автореферат разослан «9» сентября 2002 г.

Ученый секретарь диссертационного совета _____ Герасимов А.В.

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы. Сахарный диабет (СД) является одной из самых актуальных проблем современного здравоохранения. Количество больных диабетом увеличивается во всех странах. По данным ВОЗ в настоящее время в мире насчитывается более 150 млн. больных [Балаболкин М.И. и соавт., 1999]. Большая социальная значимость СД состоит в том, что он приводит к ранней инвалидизации и летальности, которая чаще всего обусловлена наличием поздних сосудистых осложнений диабета: микро- и макроангиопатий [Балаболкин М.И., 2000; Молитвословов А.Б., 1996]. В Российской Федерации ежегодно выполняются ампутации нижних конечностей по поводу диабетической гангрены у 3-5 % больных СД [Дедов И.И. и соавт., 1998]. Эта операция, травматичная как для самого больного, так и для его семьи, имеет значительные экономические последствия для общества.

В настоящее время все большее распространение получают трансплантационные методы лечения СД: трансплантация поджелудочной железы на сосудистых связях и свободная трансплантация панкреатических островков [Шумаков В.И. и соавт., 1998]. Продолжают совершенствоваться методы компенсации диабета I и II типов посредством трансплантации островковой части аллогенной и ксеногенной поджелудочной железы [Shapiro A. e.a., 2000]. Основным результатом трансплантации культур островковых клеток является предотвращение или торможение прогрессирования поздних диабетических осложнений. [Блюмкин В.Н. и соавт., 1998]. Профилактика и торможение прогрессирования вторичных диабетических осложнений, достигаемые с помощью регулярных повторных трансплантаций, могут дать не только медицинский, но и существенный социально-экономический эффект, предотвращая или отодвигая наступление инвалидности у больных диабетом и увеличивая продолжительность их жизни [Шумаков В.И. и соавт., 1998].

В качестве параметра, характеризующего влияние имплантированных островковых клеток на патологический процесс, нами использовалось морфофункциональное состояние тканевых базофилов (ТБ, тучных клеток), представляющих собой особую функционально-лабильную группу клеток, обнаруживающуюся в коже, тимусе, лимфоидной ткани, матке и в других органах [Проценко В.А. и соавт., 1987; Томилов Ф.А., 1985; Blair R.J. e.a., 1997; Fernex M., 1986]. Важнейшей особенностью этих клеток является большое разнообразие продуктов секреции, что и обуславливает их полифункциональность. Данным об участии ТБ в различных физиологических и патологических процессах, о роли их многочисленных биологически активных продуктов посвящено много научных публикаций, обобщенных в обзорах и монографиях [Адо А.Д., 1980; Гуцин И.С., 1983; Красноженов Е.П., 1996; Успенский В.И. и соавт., 1980; Чернух А.М., 1979; Dumitrascu D., 1996; Ponvert C. e.a., 1993]. Показано, что ТБ играют важную роль в регуляции микроциркуляции, трофики тканей, а также в размножении, миграции и

функции клеток. Поэтому они рассматриваются как регуляторы тканевого гомеостаза малого радиуса действия [Евтеева М.С. и соавт., 1999; Королев Ю.Н., 1997; Юрина Н.А и соавт., 1990] и, в целом как своеобразный индикаторы напряженности органа или ткани чутко реагирующий на изменение внутренней среды организма [Проценко В.А. и соавт., 1987].

К настоящему времени еще не до конца разработаны показания к выполнению имплантации островковых клеток, программы специальной подготовки больных, критерии оценки клинической эффективности и влияния на течение самого диабета, а также на развитие и прогрессирование поздних осложнений. Нуждаются в уточнении и вопросы, связанные с повторной трансплантацией, ее сроками и эффективностью [Ахметов А.С., 1998]. В связи с этим всестороннее исследование реализации механизмов трансплантационной терапии СД представляет значительный научный и практический интерес.

Цель исследования.

Изучить морфофункциональное состояние тканевых базофилов при сахарном диабете до и после имплантации островковых клеток поджелудочной железы свиньи на носителе из никелида титана.

Задачи исследования.

1. Оценить количественное содержание и морфофункциональный статус тканевых базофилов при экспериментальном аллоксановом диабете.

2. Исследовать характер изменения морфофункционального состояния тканевых базофилов при экспериментальном аллоксановом диабете на фоне ксенотрансплантации островковых клеток поджелудочной железы.

3. Определить количественное содержание и морфофункциональное состояние тканевых базофилов у больных с диабетическими ангиопатиями нижних конечностей.

4. Изучить динамику показателей морфофункционального состояния тканевых базофилов у больных с диабетическими ангиопатиями нижних конечностей в разные сроки после имплантации им островковых клеток поджелудочной железы свиньи.

5. Провести исследование биохимических и иммунологических показателей, характеризующих тяжесть течения изучаемой патологии, до и после имплантации островковых клеток.

6. Провести сравнительный анализ показателей количественных, морфологических, функциональных характеристик тканевых базофилов и показателей, отражающих тяжесть течения заболевания у обследованных лиц.

Научная новизна работы.

В результате проведенных исследований:

- впервые, используя комплекс морфофункциональных методов, проведен динамический анализ изменений реакции ТБ на фоне имплантации островковых клеток поджелудочной железы свиньи пациентам с диабетическими ангиопатиями нижних конечностей;
- впервые установлены изменения показателей количественных, морфологических и функциональных характеристик ТБ после имплантации больным

с осложнениями сахарного диабета искусственной поджелудочной железой, выращенной на пористой конструкции из никелида титана и островковой части поджелудочной железы свиньи;

- впервые показаны различия в морфофункциональных характеристиках ТБ в организме здоровых крыс, крыс с экспериментальным аллоксановым диабетом и диабетических животных после ксенотрансплантации им островковых клеток.

Практическая значимость.

Результаты исследований доказывают существование выраженных изменений показателей морфофункционального статуса ТБ у лиц с осложнениями сахарного диабета на фоне пересадки им островковых клеток поджелудочной железы свиньи.

Предложена возможность использования морфологических параметров и функциональных характеристик ТБ как критериев оценки при определении сроков проведения повторной имплантации.

Полученные результаты открывают перспективы целенаправленного воздействия на продолжительность и эффективность трансплантационной терапии диабета путем искусственной регуляции функциональной активности ТБ.

Положения, выносимые на защиту.

При экспериментальном аллоксановом диабете морфофункциональное состояние ТБ характеризуется стойким угнетением количественного содержания, секреторной активности и показателя генеза, сопровождающимся возрастанием значений показателя функциональной активности.

У лиц с осложнениями сахарного диабета (диабетическими ангиопатиями нижних конечностей) после проведенной им имплантации искусственной поджелудочной железы ТБ реагируют значительным возрастанием показателей функциональной и секреторной активности, увеличением их численности и количества молодых форм клеток. Реакция ТБ достигает своего пика к 2 мес после имплантации.

Реакция ТБ сопровождается снижением концентрации глюкозы и возрастанием концентраций С-пептида, антител к инсулину и некоторых показателей гуморального иммунитета у больных с диабетическими ангиопатиями нижних конечностей на фоне имплантации островковой части ксеногенной поджелудочной железы.

Апробация работы.

Основные положения работы докладывались и обсуждались на научно-практической конференции «Актуальные вопросы экспериментальной морфологии», посвященной 70-летию со дня рождения профессора Рыжова А.И. (Томск, 1999), научно-практической конференции «Факторы клеточного и гуморального иммунитета при различных физиологических и патологических состояниях» (Челябинск, 2000), научно-практической конференции «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической морфологии», посвященной 150-летию со дня рождения профессора Догеля А.С. (Томск,

2002), на научных семинарах кафедры микробиологии Сибирского государственного медицинского университета (1999-2002).

Объем и структура работы.

Диссертация изложена на 135 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, характеристики материала и методов исследований, описания результатов и их обсуждения, выводов, списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 19 таблицами и 11 рисунками. Содержит 1 приложение. Список литературы включает 106 отечественных и 76 зарубежных источников.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ СОБСТВЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводились на базе кафедры микробиологии Сибирского государственного медицинского университета, Госпитальной клиники СГМУ и ЦНИЛ СГМУ.

Обследовали 57 больных с осложнениями сахарного диабета I типа (диабетические ангиопатии нижних конечностей), в возрасте от 40 до 73 лет. В том числе 23 мужчины и 34 женщины.

Все обследованные были разделены на группы:

- 1) больные с осложнениями сахарного диабета до имплантации искусственной поджелудочной железы, выращенной на пористой конструкции из никелида титана и островковой части поджелудочной железы свиньи;
- 2) пациенты с осложнениями сахарного диабета в разные сроки после имплантации искусственной поджелудочной железы, выращенной на пористой конструкции из никелида титана и островковой части поджелудочной железы свиньи (табл. 1).

В качестве доноров ксеноргана использовали молодых поросят, прошедших тщательную ветеринарную и санитарно-гигиеническую проверку. Свиною поджелудочную железу обрабатывали по методике, разработанной в НИИ трансплантологии и искусственных органов [Шумаков В.И. и соавт., 1995]. Культивированная на подложке из пористого никелида титана островковая часть поджелудочной железы свиньи [Дамбаев Г.Ц. и соавт., 1996; Шумаков В.И. и соавт., 1995] имплантировалась в прямую мышцу живота с помощью троакара под местной анестезией (Разрешение комитета по новой медицинской технике; протокол № 11 заседания комиссии по инструментам, приборам, аппаратам и материалам, применяемым в общей хирургии от 23.12.99).

Для решения поставленных задач в рамках данной работы проводилось биохимическое и иммунологическое исследование сыворотки крови. Определяли концентрацию глюкозы (глюкозооксидазным методом), С-пептида и антител к инсулину (методом радиоиммунологического анализа), иммуноглобулинов А, G, M (методом радиальной иммунодиффузии в геле по Манчини).

Объектами для исследования служили сыворотка крови и фрагмент кожи с подкожной клетчаткой весом 5-10 г.

Таблица 1

Характеристика групп обследованных по полу и возрасту

Группы обследованных	Количество человек	Возраст, лет	Количество мужчин	Количество женщин
До имплантации	44	40-73	19	25
1 мес после имплантации	12	40-61	5	7
2 мес после имплантации	10	42-73	2	8
3-6 мес после имплантации	7	41-64	4	3
6-12 мес после имплантации	15	48-72	4	11
1-2 года после имплантации	3	45-56	1	2

Кроме клинических исследований были проведены эксперименты на лабораторных крысах с аллоксановым диабетом. Опыты выполнялись на 60 взрослых беспородных крысах-самцах массой 180-220 г. Для моделирования аллоксанового диабета у животных использовали 4% раствор аллоксангидрата ("Лахема-Хемапол", Чехословакия), который вводили подкожно однократно в дозе 400 мг/кг [Сапрыкина Э.В. и соавт., 1999]. Искусственную поджелудочную железу имплантировали в мышцы живота крыс, которых предварительно усыпляли эфиром. Имплантацию островковых клеток свиньи на носителе из пористого никелида титана проводили спустя 7 сут после введения 4% раствора аллоксангидрата крысам с подтвержденной гипергликемией. Исследуемым материалом являлись кожа, брыжейка, перитонеальная жидкость, периферическая кровь. Материал для исследования забирали на 7, 15, 30, 45, 60 и 90 сут после имплантации островковых клеток (группа из 30 животных), параллельно изучалась группа с аллоксановым диабетом, без имплантации (25 крыс) и группа интактных животных (5 крыс).

Парафиновые срезы кожи и пленочные препараты брыжейки окрашивали 0,1% раствором толуидинового синего. Перитонеальную жидкость - 0,3% раствором нейтрального красного. При проведении количественной оценки функциональной активности ТБ кожи также применяли 0,3% раствор нейтрального красного.

Используя гистологические методы, мы изучали морфофункциональные характеристики ТБ. Оценивалось количественное содержание, индекс активности (отношение числа дегранулированных клеток к количеству всех интактных) и индекс созревания (отношение количества молодых к числу зрелых форм ТБ), показатель степени дегрануляции ТБ в ответ на стимуляцию активатором секреции пирогеналом.

Статистическую обработку данных проводили с помощью t-критерия Стьюдента и определяли значимость различий (p). Разницу двух сравниваемых величин (фоновых и контрольных, фоновых и опытных, контрольных и опытных значений) считали достоверной при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенного нами исследования продемонстрировали, что ТБ реагируют на диабетическое состояние изменением количественного содержания, морфологических и функциональных признаков. Так, полученные данные свидетельствуют, что ТБ кожи крыс реагировали на экспериментальный аллоксановый диабет уменьшением численности в среднем на 40-60% и незначительным повышением функциональной активности. Результаты изучения морфофункционального статуса ТБ брыжейки у крыс при введении аллоксана показали, что количественное содержание ТБ достоверно уменьшалось в течение всего эксперимента на 35-70%. Показатель функциональной активности мезентериальных ТБ в группе экспериментальных диабетических животных превышал фоновые данные на 5-10% в течение всего опыта. Содержание ТБ перитонеальной жидкости крыс достоверно снижалось относительно нормы в среднем на 45%.

У диабетических крыс наблюдалось снижение секреторной активности по сравнению с интактными животными в среднем 10% (рис. 1). Максимальное угнетение показателя дегрануляции ТБ в ответ на стимуляцию пирогеналом выявлено на 30 сут опыта (на 25% ниже исходных значений; $p < 0,001$). Значения индекса созревания ТБ кожи у крыс с аллоксановым диабетом были существенно снижены относительно нормального уровня (на 35-50%) в течение всего опыта. Аналогичная динамика соотношения молодых и зрелых форм ТБ отмечалась при изучении брыжейки и перитонеальной жидкости.

Необходимо отметить, что уже через 7 сут после введения аллоксана у животных развивался отчетливо выраженный СД. Уровень гликемии натошак в эти сроки составлял 207% ($p < 0,001$) от фоновых показателей (рис.1). Из 55 крыс, использованных в эксперименте с индукцией аллоксанового диабета, за первые семь суток после введения аллоксана погибло 7 животных и, соответственно, смертность при «недельном СД» составила 13%, что свидетельствует о серьезности метаболических расстройств при развитии экспериментального СД. Максимальная концентрация глюкозы в крови аллоксановых крыс наблюдалась на 60 сут от начала эксперимента и составляла 306% ($p < 0,001$) относительно уровня глюкозы в крови здоровых животных.

Таким образом, состояние ТБ в группе диабетических крыс характеризовалось стойким угнетением показателей морфофункционального статуса на фоне незначительного повышения функциональной активности в начальные сроки после инъекции аллоксана. Понижение значений, характеризующих тучноклеточную реакцию при экспериментальном СД, сопровождалось выраженной гипергликемией (рис.1).

Вероятно такая картина морфофункционального состояния ТБ в значительной степени опосредуется дефицитом инсулина в организме экспериментальных животных, индуцированном применением аллоксана, вызывающем резкое подавление функции инсулярной системы.

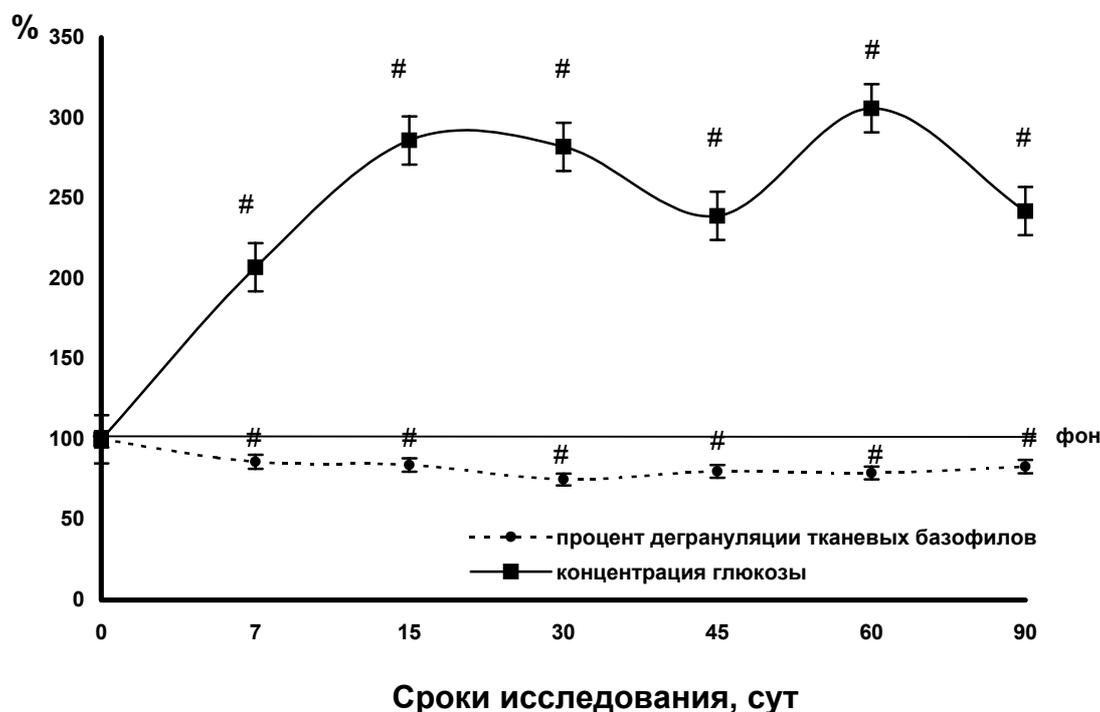


Рис.1. Динамика секреторной активности тканевых базофилов в перитонеальной жидкости и концентрации глюкозы в крови при экспериментальном аллоксановом диабете у крыс.

Примечание: здесь и далее в рисунках символом # обозначена достоверность различий при сравнении с фоновыми значениями; символом * обозначена достоверность различий, полученная при сравнении опытных и контрольных групп.

Практически во всех тканях организма инсулин влияет на обмен углеводов, жиров, белков и электролитов, увеличивая транспорт глюкозы, белка и других веществ через мембрану клетки [Балаболкин М.И., 2000; Лейкок Д.Ф. и соавт., 2000; Потемкин В.В., 1999; Taylor S.I. e.a., 1996]. К этому гормону чувствительны все ткани организма, кроме нервной, хрусталика, сетчатки и эритроцитов [Потемкин В.В., 1999]. Своё биологическое действие на уровне клетки инсулин осуществляет через соответствующий рецептор. Взаимодействие инсулина с рецептором приводит к повышению активности протеинкиназы С, к стимуляции специфической фосфолипазы С, к гидролизу гликозилфосфатидилинозитола и образованию двух вторичных мессенджеров: инозитолтрифосфата (ИТФ) и диацилглицерола (ДАГ). ИТФ высвобождает кальций из эндоплазматического ретикулума. ДАГ действует на кальмодулин и протеинкиназу С, которая фосфорилирует различные субстраты, приводя к изменению активности клеточных систем [Балаболкин М.И., 1998; Лейкок Д.Ф. и соавт., 2000].

Ключевой особенностью ТБ является способность к активному секреторному процессу с выделением медиаторов в результате дегрануляции.

Дегрануляция ТБ индуцируется иммунологическими и неиммунологическими факторами [Красноженов Е.П., 1996; Проценко В.А. и соавт., 1987; Peachele P.T. e.a., 1987]. Важная роль в передаче сигнала от рецептора к механизмам клетки, которые ведают секреторной дегрануляцией, отводится гуанинсодержащим белкам мембраны. При участии этих белков из фосфолипидов клеточной мембраны образуются две регуляторных молекулы, выполняющие функцию вторичных мессенджеров: ИТФ и ДАГ [Маянский Д.Н. и соавт., 1997]. ИТФ высвобождает ионы кальция из эндоплазматической сети, тогда как ДАГ действует, активируя протеинкиназу С. Под влиянием протеинкиназы С, которая фосфорилирует различные субстраты, начинается секреторная дегрануляция.

Таким образом, связывание молекулы инсулина со специфическим рецептором приводит к образованию двух регуляторных молекул-посредников: ИТФ и ДАГ, опосредующих основное действие инсулина – усиление транспорта глюкозы через мембрану клетки. Эти же две молекулы-мессенджеры опосредуют секрецию медиаторов из ТБ. Ключевым звеном указанных процессов является активация протеинкиназы С. При недостатке инсулина в результате развития экспериментального СД, вполне закономерно угнетение показателя дегрануляции ТБ в ответ на раздражение стимулятором пирогеналом, выявленное в наших исследованиях (рис. 1).

Кроме того, дегрануляция ТБ находится под контролем циклических нуклеотидов [Маянский Д.Н. и соавт., 1997]. Один из них циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ) усиливает, в то время как его антипод - циклический аденозинмонофосфат (цАМФ), напротив, тормозит секрецию медиаторов ТБ. Инсулин, в свою очередь, понижает концентрацию цАМФ в клетках-мишенях, а так же, предположительно, повышает концентрацию цГМФ [Лейкок Д.Ф. и соавт., 2000; Потемкин В.В., 1999], взаимодействуя с рецептором на мембране клетки. Соответственно дисбаланс циклических нуклеотидов при дефиците инсулина в организме может играть определенную роль в депрессии секреторной активности ТБ.

В данной работе в качестве иммунологического критерия состояния больных с диабетическими ангиопатиями нижних конечностей до и после имплантации им искусственной поджелудочной железы использовалось количество иммуноглобулинов разных классов в сыворотке крови.

При анализе показателей гуморального иммунитета у больных с исследуемой патологией установлено, что количество IgG и IgM в сыворотке крови больных СД не выходит за рамки нормальных значений [71], не значительно превышая нижний порог. В то время как уровень IgA в крови обследованных на 75% выше средних значений нормы для данного класса иммуноглобулинов. Повышение содержания IgA, по видимому, связано с иммунным ответом на введение экзогенного инсулина при инсулинотерапии [Хайтов Р.М. и соавт., 1992], а также может объясняться повышенным инфицированием больных с диабетическими ангиопатиями нижних конечностей, склонных к развитию местных инфекционно-воспалительных заболеваний [Бондарь И.А., 1997].

Значения показателей гуморального иммунитета в группе лиц с диабетическими ангиопатиями нижних конечностей после имплантации искусственной поджелудочной железы свидетельствовали о возрастании концентраций IgG и gM в сыворотке крови до верхних пределов нормы в период 1-6 мес после проведенной пересадки островковых клеток. Повышение концентраций IgG и IgM сопровождалось достоверным снижением уровня IgA в крови на 37% к 2 мес ($p < 0,01$), и на 47% ($p < 0,001$) к 6 мес после имплантации. Начиная с 6 мес после выполнения имплантации отмечалось незначительное повышение содержание IgA.

В качестве показателя, характеризующего тяжесть течения изучаемой патологии, нами использовался уровень С-пептида, представляющего собой молекулу, образующуюся в ходе созревания и секреции инсулина [Блюмкин В.Н. и соавт., 1998; Потемкин В.В., 1999]. При исследовании сыворотки крови группы пациентов с диабетическими ангиопатиями нижних конечностей нами было отмечено снижение концентрации С-пептида на 14% по сравнению с нижним порогом нормы [Потемкин В.В., 1999], что свидетельствует о инсулиновой недостаточности в организме обследованных больных (рис. 2).

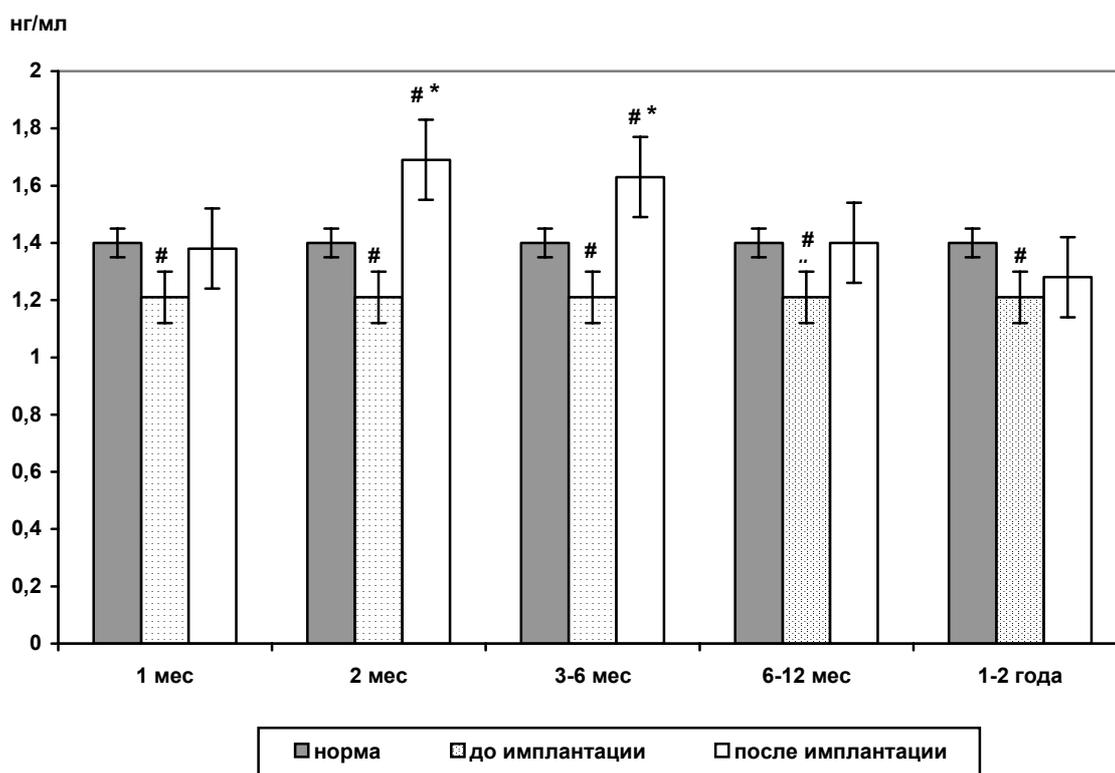


Рис. 2. Концентрация С-пептида в сыворотке крови больных с осложнениями сахарного диабета в разные сроки после ксенотрансплантации им культур островковых клеток

Полученные значения концентрации С-пептида в крови больных с осложненным СД после имплантации искусственной поджелудочной железы демонстрировали достоверное возрастание ($p < 0,05$) уровня С-пептида (на 22%) спустя 2 мес после проведенной имплантации по сравнению с контрольной группой (до имплантации). В период 3-6 мес после пересадки ост-

ровковых клеток было отмечено незначительное снижение уровня С-пептида, но при этом значения данного параметра не опускались ниже порога нормы. Начиная с 6 мес после выполнения имплантации показано снижение концентрации С-пептида в крови обследованных лиц (рис. 2). Динамика другого показателя, отражающего уровень продукции инсулина в организме - содержание антител к инсулину в сыворотке крови, была следующей: у больных с изучаемой патологией после имплантации им островковых клеток концентрация антител к инсулину достоверно повышалась ($p < 0,05$) в период 2-6 мес после пересадки в среднем на 26%, относительно группы диабетических больных, обследованных до имплантации культур островковых клеток.

Особый интерес представляют данные, характеризующие динамику концентрации глюкозы в сыворотки крови обследованных лиц (рис. 3). Уже спустя 1 мес после имплантации островковых клеток выявлена тенденция к нормализации уровня глюкозы. Достоверное снижение концентрации сахара в крови больных с изучаемой патологией относительно концентрации глюкозы у контрольной группы пациентов выявлено на период 3-6 мес после ксенотрансплантации островковых клеток (на 37%). Минимальные значения данного показателя регистрировались на 6-12 мес после пересадки (на 40% ниже по сравнению с группой пациентов, обследованных до имплантации).

Таким образом, полученные нами значения показателей, отражающих тяжесть течения осложненного СД, наряду с результатами клинических наблюдений свидетельствуют о том, что имплантация культур островковых клеток оказывает стабилизирующее влияние на течение СД, способствует уменьшению тяжести гипергликемических состояний и снижению потребности в экзогенном инсулине.

Комплексный анализ количественных, морфологических и функциональных характеристик ТБ у больных с изучаемой патологией до и после ксенотрансплантации им островковых клеток поджелудочной железы выявил изменение всех параметров морфофункционального статуса после проведенной пересадки. Так, показано, что общее количество ТБ до имплантации островковых клеток составляло в среднем 38 клеток в 30 полях зрения и достоверно отличалось от такового в группах больных, обследованных в разные сроки после имплантации, кроме группы изученной спустя 1 мес после пересадки (рис. 4). Содержание ТБ в коже к 2 мес после имплантации превышало исходные показатели на 50%, и к 3 мес достигало максимальных значений - в 1,8 раза выше исходных. Начиная с 6 мес после имплантации, количественное содержание ТБ стабилизировалось.

Значения показателя функциональной активности у больных СД спустя 2 мес после имплантации было на 90% достоверно ($p < 0,05$) выше по сравнению со значением аналогичного показателя в контрольной (до имплантации) группе. Достоверных различий при сравнении с другими группами не наблюдалось, но в целом была выявлена тенденция возрастания ИА в течение первых 6 мес после проведения ксенотрансплантации. Начиная с 6 мес отмечались снижение значений до уровня исходных и стабилизация показателя соотношения числа дегранулированных и интактных базофилов.

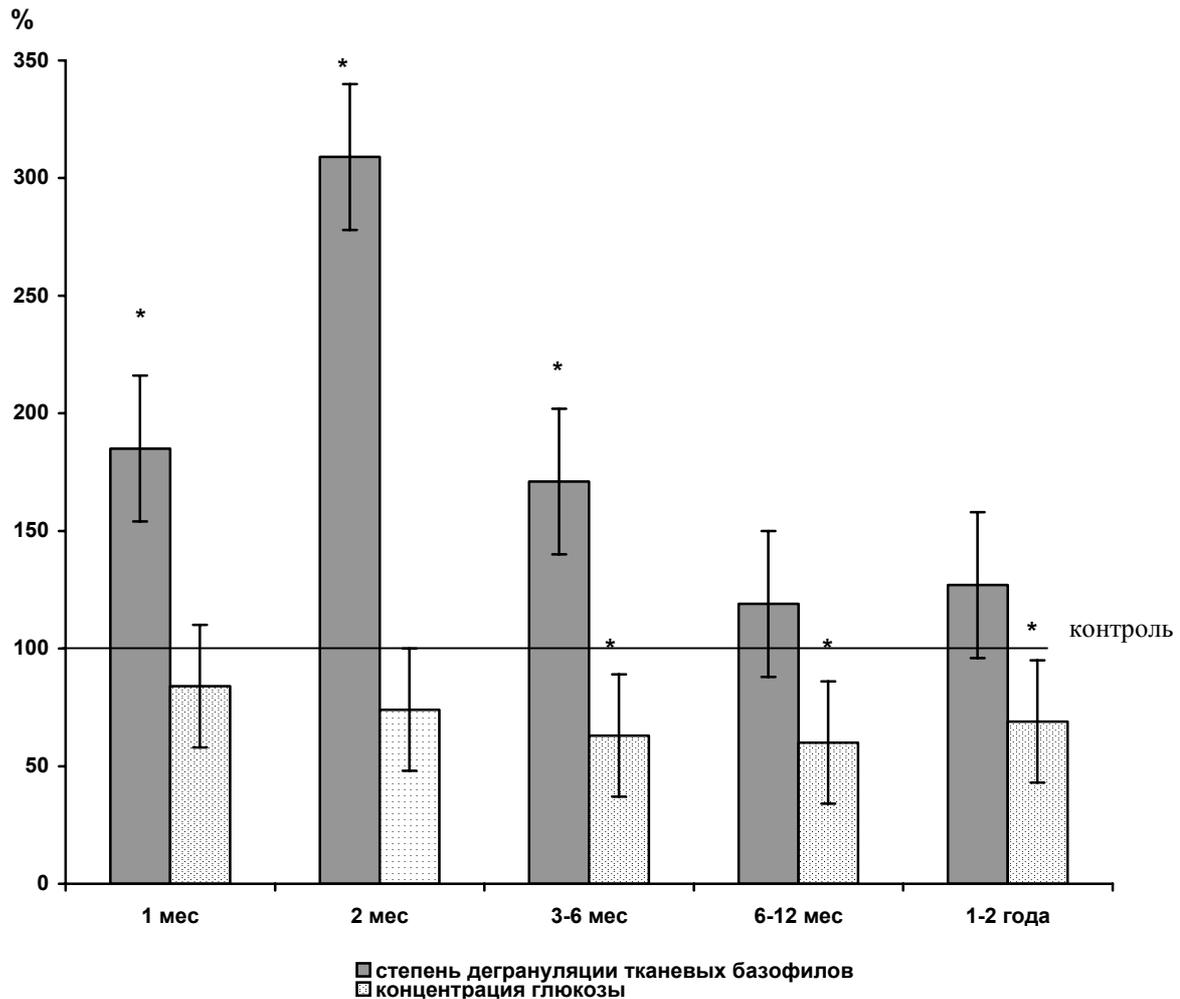


Рис. 3. Динамика секреторной активности тканевых базофилов в коже и концентрации глюкозы в крови больных с осложнениями сахарного диабета в разные сроки после ксенотрансплантации им культур островковых клеток

Показатель степени дегрануляции ТБ кожи на активатор секреции пирогенал у пациентов с диабетическими ангиопатиями нижних конечностей спустя 1 мес после имплантации искусственной поджелудочной железы почти в двое превышал контрольные значения. К 2 мес секреторная активность ТБ в коже достигала своего максимума - на 209% выше исходных значений (рис.3). На период 3-6 мес после пересадки показатель степени дегрануляции ТБ был еще достоверно ($p < 0,001$) в 1,7 раза выше доимплантационных значений. Затем отмечалось постепенное снижение этого показателя.

Динамика индекса созревания тучных клеток, определяющегося соотношением количества молодых к числу зрелых форм базофилов, в организме больных с изучаемой патологией после имплантации островковых клеток была следующей: к 1 мес после пересадки ИС достоверно ($p < 0,05$) повышался на 70% относительно контрольной группы; значения этого показателя оставались существенно повышенными в течение всего периода исследований и достигали максимума к 2 мес после имплантации искусственной поджелудочной железы, в 2,4 раза превышая значение в контрольной группе. Стаби-

лизация ИС регистрировалась, начиная с 6 мес. На период 6-12 мес после ксенотрансплантации этот показатель составлял 182%, а на период 1-2 года после пересадки – 173% относительно фоновых значений.

Изучение морфофункционального статуса ТБ лабораторных крыс при экспериментальном аллоксановом диабете на фоне имплантации искусственной поджелудочной железы выявило схожую динамику всех исследованных показателей. Так, например, уже на 7 сут опытной показатель секреторной активности ТБ перитонеальной жидкости взятой от аллоксановых животных после пересадки им островковых клеток достоверно повышался на 85% относительно группы крыс с диабетом, изученных до имплантации культур островковых клеток, а к 45 сут достигал максимальных значений, превышая контрольные показатели более чем в 2 раза. Затем значения показателя дегрануляции ТБ нормализовались. Отличия от данных полученных в клинических исследованиях заключались в том, что в эксперименте, проведенном на крысах с аллоксановым диабетом, реакция ТБ достигала своего пика на 5-6 недели после пересадки островковых клеток, тогда как значения морфофункциональных параметров ТБ в материале взятом у больных с диабетическими ангиопатиями нижних конечностей были максимальны на 2 мес после проведенной имплантации.

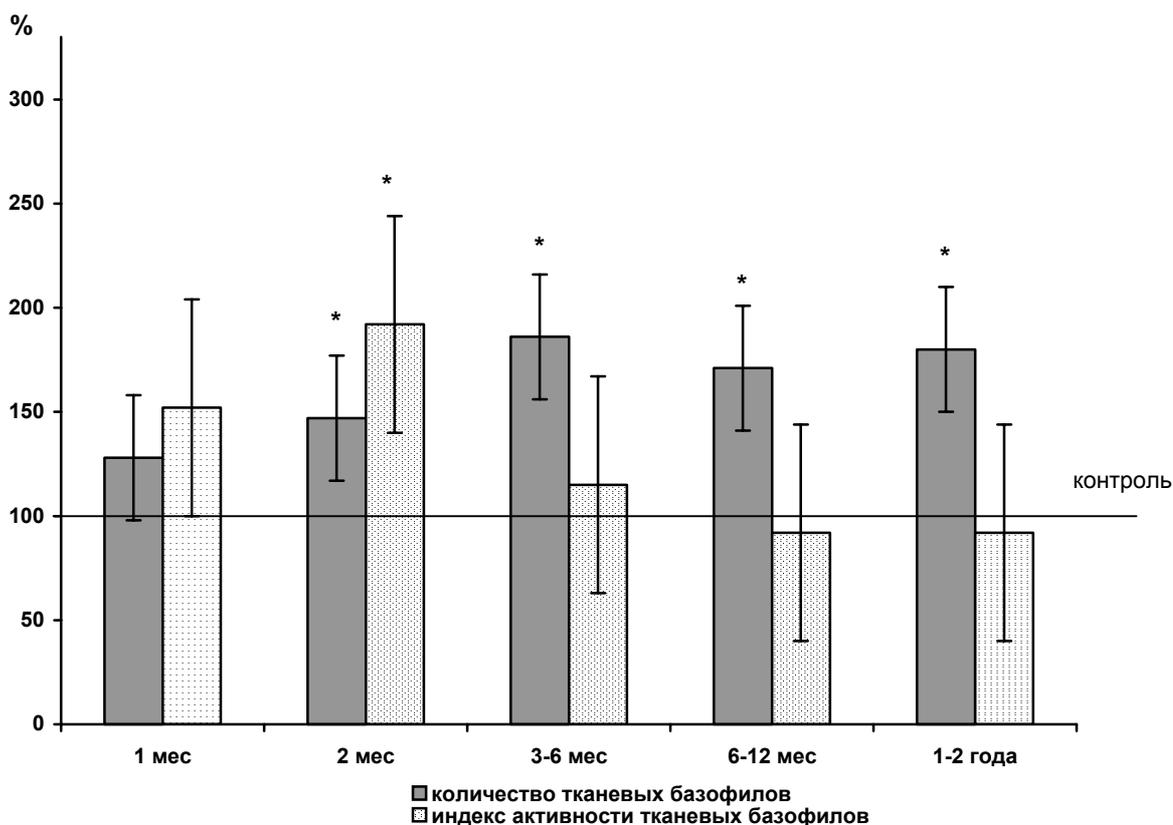


Рис. 4. Динамика количества и функциональной активности тканевых базофилов в коже больных с осложнениями сахарного диабета в разные сроки после ксенотрансплантации им культур островковых клеток

Таким образом, в первые месяцы после трансплантации островковой части ксеногенной поджелудочной железы наблюдалось выраженное повышение функциональной и секреторной активности, сопровождаемое некоторым повышением количества ТБ у лиц с осложнениями СД. Реакция ТБ достигала пика к 2 мес недели после имплантации, все морфофункциональные параметры кроме численности значительно превышали контрольные показатели. Количество ТБ было максимально в период 6-12 мес после имплантации островковых клеток. Такая задержка динамики роста количественных показателей ТБ связана с высокой функциональной напряженностью базофилов в ранние сроки после имплантации и, как следствие, снижением количества ТБ в результате длительной и активной дегрануляции (рис. 4). Достигнув пика, активность ТБ постепенно снижалась, приближаясь к контрольным значениям; начиная с 6 мес после имплантации, морфофункциональные параметры ТБ стабилизировались, что сопровождалось значительным снижением концентрации глюкозы в крови больных с осложнениями сахарного диабета (рис. 3). Индекс созревания оставался несколько повышенным на период 1-2 года после проведенной имплантации островковых клеток, что свидетельствует о продолжающейся стимуляции генеза ТБ.

Необходимо отметить, что в нашей работе проводился комплексный морфофункциональный анализ ТБ кожи, взятой из области хирургического разреза у пациентов с диабетическими ангиопатиями нижних конечностей до и после пересадки ксеногенной части поджелудочной железы. Однако при сравнении данных разных авторов оказалось, что при СД кожа различных областей претерпевает в целом сходные изменения [Удовиченко О.В. и соавт., 2001].

Выявленная в наших исследованиях динамика морфофункционального состояния ТБ у больных с осложненным СД после пересадки им ксеногенной поджелудочной железы обусловлена, по-видимому, прежде всего секрецией инсулина β -клетками имплантированных культур островковых клеток. Показано, что взаимодействие инсулина с рецептором приводит к повышению активности протеинкиназы С через образование двух вторичных мессенджеров: ИТФ и ДАГ [Лейкок Д.Ф. и соавт., 2000; Потемкин В.В., 1999; Flatt P.R. e.a., 1991]. Эти же две регуляторные молекулы, активируя протеинкиназу С, опосредуют секрецию медиаторов из ТБ [Маянский Д.Н. и соавт., 1997]. Дегрануляция ТБ так же находится под контролем циклических нуклеотидов [Маянский Д.Н. и соавт., 1997]: цГМФ, который усиливает дегрануляцию и цАМФ, который, напротив, тормозит секрецию медиаторов ТБ. Инсулин, в свою очередь, понижает концентрацию цАМФ в клетках-мишенях, а так же, предположительно, повышает концентрацию цГМФ [Лейкок Д.Ф. и соавт., 2000; Потемкин В.В., 1999], взаимодействуя с рецептором на мембране клетки.

Имеются отдельные литературные данные, подтверждающие эти предположения. Показано, что при обработке диабетических крыс инсулином сократительная реакция изолированных трахей существенно повышалась и была сопоставима с таковой у здоровых животных [Casaco A. e.a., 1991]. Инъ-

екция крысам с аллоксановым диабетом инсулина восстанавливала основные параметры ТБ [Diaz B.L. e.a., 1996; Diaz B. e.a., 2001] и нормализовала функциональное состояние тучных клеток [Дыгай А.М. и соавт., 1992], а введение инсулина нативным животным значительно повышало численность ТБ в плевральной полости крыс [Diaz B.L. e.a., 1996; Diaz B. e.a., 2001].

Возможно играет определенную роль и способность инсулина к ингибированию свободнорадикального окисления. Он может реагировать с перекисными радикалами липидов, прерывать цепную реакцию окисления [Потемкин В.В., 1999] и, соответственно, влиять на процессы ПОЛ, активирующиеся при СД [Балаболкин М.И., 2000; Бондарь И.А., 1997; Завершхановский Ф.А. и соавт., 1987; Потемкин В.В., 1999; Смирнова О.М. и соавт., 1999] и способствующие увеличению «жесткости» мембранного бислоя, дестабилизации цитоплазматических мембран и нарушению инсулинсвязывающей активности в мембранах клеток [Косенко Е.А. и соавт., 1999; Микаэлян Н.П. и соавт., 1999].

Стабилизацию и активацию тучноклеточной реакции после имплантации инсулинпродуцирующих клеток может опосредовать и нормализация метаболических процессов в клетке, регулируемых инсулином - стимуляция транспорта глюкозы, аминокислот, жирных кислот через мембрану клетки; стимуляция синтеза РНК и ДНК; стимуляция синтеза белка; активация липогенеза и синтеза жирных кислот [Лейкок Д.Ф. и соавт., 2000; Потемкин В.В., 1999; Taylor S.I. e.a., 1996]. Имеются данные о том, что инсулин непосредственно участвует в процессе роста и дифференциации тканей [Балаболкин М.И., 2000].

При развитии раневого процесса на фоне СД возникающие метаболические изменения вызывают несвоевременное наступление апоптоза, нарушая соотношение фаз раневого воспалительного процесса и в конечном итоге препятствуя заживлению [Мохорт Т.В. и соавт., 2000]. Этот факт имеет особое значение в нашем случае, поскольку, пациенты с диабетическими ангиопатиями нижних конечностей исследуемой группы демонстрировали склонность к развитию язвенно-некротических процессов и гангрены. Экзогенное введение ростовых факторов, например, инсулиноподобного фактора роста, которые стабилизировали пролиферативно-метаболические взаимоотношения в клетке, давало антиапоптогенный эффект [Ortiz A. e.a., 1997; Zhang W. e.a., 1997]. Инсулиноподобные ростовые факторы, оказывающие протективное действие на развитие ИЗСД, вызывают прямое регулирующее воздействие на гемопоэз, лимфопоэз и функционирование иммунной системы [Панков А. Ю., 2000]. Можно предположить, что и инсулин обладает способностью стимулировать генез клеток, в том числе ТБ. Так, обнаружено, что введение инсулина нативным крысам значительно повышало численность ТБ в организме лабораторных животных [Diaz B.L. e.a., 1996; Diaz B. e.a., 2001].

Эффекты пересадки островковых клеток не объясняются только секрецией инсулина пересаженными β -клетками [Блюмкин В.Н. и соавт., 1998]. Существует предположение, согласно которому под влиянием пересадки

происходят мобилизация пролиферативного пула эпителиальных клеток собственной поджелудочной железы больных ИЗСД и эшелонированная дифференцировка клеток-предшественников в β -клетки [Блюмкин В.Н. и соавт., 1998; Скалецкий Н. Н. И соавт., 1996]. Возможно, что определенную роль в стабилизации течения лабильного ИЗСД и снижении потребности реципиента в экзогенном инсулине играет увеличение после трансплантации числа инсулиновых рецепторов в периферических тканях [Подшивалин А. В., 1993]. Показано, что при введении С-пептида больным ИЗСД или животным с экспериментальным ИЗСД наблюдается в основном такое же антидиабетическое действие, как после алло- или ксенотрансплантации островковых клеток больным. В таком случае действие свободной трансплантации островковых клеток на клетки и ткани организма можно объяснить и "С - пептидным" эффектом [Блюмкин В.Н. и соавт., 1998; Скалецкий Н.Н. и соавт., 1996].

Интересными представляются данные, свидетельствующие о дисфункции всех звеньев иммунной системы при СД [Новицкий В.В. и др., 1997; Удовиченко О.В. и соавт., 2001] в свете известных фактов о наличии взаиморегулирующих эффектов между ТБ и иммунокомпетентными клетками, в первую очередь Т-лимфоцитами [Дыгай А.М. и соавт., 1992; Красноженов Е.П., 1996; Маянский Д.Н. и соавт., 1997; Amon E.U., 1991; Cavallo M. e.a., 1994; Freund M. e.a., 1994; Yurt R. e.a., 1990]. Так, например, интерлейкин-4, секретируемый как ТБ, так и Т-лимфоцитами, стимулирует В-клеточную пролиферацию, синтез IgG и IgE, активирует Т-хелперы и может проявлять себя как фактор роста для ТБ [Суворова К.Н., 1998]. Показано, что гистамин, лейкотриены, простагландины и другие медиаторы ТБ вызывают модуляцию функции лимфоцитов [Enestrom S. e.a, 1997; Marone G., 1988].

Для СД характерно снижение Т-лимфоцитов, изменение субпопуляций иммунокомпетентных клеток и нарушение функции лимфоцитов и макрофагов [Бондарь И.А., 1997; Новицкий В.В. и др., 1997]. Можно предположить, что причиной снижения численности тучноклеточной популяции и угнетения морфофункционального статуса ТБ в целом при СД, наряду с прочими, является нарушение цитокинного стимулирования со стороны других клеток организма, в частности Т-лимфоцитов, содержание которых при СД снижается, а параллельно страдает их функциональная способность. В целом, прогрессирование поздних осложнений СД определяется развитием сложных метаболических нарушений и тканевой гипоксии, которые приводят к глубоким изменениям внутриклеточного метаболизма и проявляются изменением функции иммунокомпетентных клеток и нарушением продукции цитокинов [Бондарь И.А., 1997]. В тоже время имплантация островковых клеток способствует нормализации клеточных и гуморальных факторов иммунной системы [Воробьева Е.А., 1992; Дамбаев Г.Ц. и соавт, 1996; Скалецкий Н.Н. и соавт., 1996]. Возможно, что выявленное в первые месяцы после трансплантации островковой части ксеногенной поджелудочной железы повышение функциональной и секреторной активности ТБ (рис. 3), сопровождаемое некоторым повышением их количества, у лиц с диабетическими ангиопатиями нижних конечностей, а также стимуляция генеза ТБ на период 1-2 года после

проведенной имплантации связаны с нормализацией регулирующего воздействия со стороны цитокинов иммунокомпетентных клеток.

Следует отметить, что нарушение всех видов обмена ведет при СД к ослаблению иммунных свойств организма и понижению сопротивляемости инфекциям [Бондарь И.А., 1997; Потемкин В.В., 1999]. Выявленное в нашей работе снижение уровня IgA в крови обследованных лиц на период 2-6 мес после имплантации может свидетельствовать о нормализации местного гуморального иммунитета и, как следствие, понижении вероятности развития инфекционных осложнений у больных с диабетическими ангиопатиями после ксенотрансплантации культур островковых клеток. Возрастание концентраций IgG и IgM в сыворотке крови до верхних пределов нормы в период 1-12 мес после пересадки островковых клеток демонстрирует, по-видимому, то что проведенная имплантация не вызывает серьезных иммунологических сдвигов, способных усугубить течение диабетических осложнений. Это связано со степенью иммунотолерантности, которой удалось достичь в отношении имплантированной ткани благодаря использованию носителя из никелида титана, обладающего наиболее оптимальными физико-химическими и биомедицинскими свойствами [Gunther V.E. e.a., 2000], делающими его “невидимым” для гомеостатических систем организма.

Результаты представленной работы открывают новые перспективы целенаправленного воздействия на продолжительность и качество трансплантационной терапии СД путем искусственной регуляции функциональной активности ТБ. О возможности воздействия на различные патологические процессы через влияние на функциональное состояние тучных клеток свидетельствуют данные, приведенные в работе Красноженова Е.П. (1996). В связи с этим особую важность представляют литературные источники в которых показано участие тучноклеточных продуктов в развитии осложнений СД. Так факты полученные Колесниковой А.А. (1999) демонстрируют, что применение пирогенала способно приводить к снижению чувствительность животных к диабетогенному действию аллоксана и благоприятно влиять на течение экспериментального СД, в частности, вызывать снижение гипергликемии. По мнению Симоненкова А.П. и соавт. (1998), для профилактики и лечения диабетических ангиопатий необходимо применять серотонин, поскольку обнаружено, что при осложненном СД, кроме недостатка инсулина, возникает также недостаточность еще одного эндогенного вещества, продуцируемого ТБ, — серотонина. Установлено, что гепарин, являясь практически единственным из известных антикоагулянтов прямого действия животного происхождения, при пероральном введении оказывает выраженное антидиабетогенное действие [Ульянов А.М. и соавт., 1999].

ВЫВОДЫ

1. Тканевые базофилы включаются в реакцию организма после имплантации островковых клеток поджелудочной железы свиньи больным с диабетическими ангиопатиями нижних конечностей. Реакция тканевых базофилов проявляется в виде изменения количественного содержания, морфологических признаков и секреторной активности.
2. Тканевые базофилы реагировали на экспериментальный аллоксановый диабет стойким снижением значений показателей морфофункционального статуса на фоне незначительного повышения функциональной активности в начальные сроки после инъекции аллоксана. Угнетение морфофункциональных параметров сопровождалось ростом концентрации глюкозы в крови животных.
3. В ранние сроки после имплантации островковой части ксеногенной поджелудочной железы больным с осложнениями сахарного диабета наблюдалось выраженное повышение функциональной и секреторной активности, увеличивалось количество молодых форм клеток по сравнению со зрелыми. Реакция тканевых базофилов достигала максимума к 2 мес после пересадки и постепенно снижалась, приближаясь к исходным значениям к 6-24 мес после имплантации.
4. Динамика морфофункционального статуса тканевых базофилов после проведенной пересадки островковых клеток однотипна у больных с осложнениями сахарного диабета и животных с экспериментальным аллоксановым диабетом.
5. Активация показателей морфофункционального состояния тканевых базофилов, выявленная в группе лиц с диабетическими ангиопатиями нижних конечностей после имплантации искусственной поджелудочной железы, сопровождалась возрастанием уровня С-пептида и содержания антител к инсулину на фоне снижения концентрации глюкозы в сыворотке крови обследованных.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Препараты бактериального происхождения как индукторы дегрануляции тучных клеток / В соавторстве с Красноженовым Е.П., Бочкаревой О.П. // Актуальные вопросы экспериментальной морфологии. - Томск, 1999. – С. 61-62.
 2. Оценка степени устойчивости организма к раздражителям различной природы по модуляции показателей морфофункционального статуса тканевых базофилов / В соавторстве с Красноженовым Е.П., Бочкаревой О.П. // Материалы межрегиональной научной конференции Сибири и Дальнего Востока, посвященной 150-летию со дня рождения академика И.П. Павлова. - Томск, 1999. – С. 197-198.
 3. Роль тканевых базофилов в процессе инфекции / В соавторстве с Красноженовым Е.П., Карповой М.Р. // Сибирский медицинский журнал. - 2000, №1. – С. 21-24.
 4. Участие клеточной системы «тканевой базофил» в обеспечении клеточной защиты организма от патогенных факторов / В соавторстве с Красноженовым Е.П., Бочкаревой О.П. // Материалы международной конференции «Естествознание на рубеже столетий». – М., 2001. – С. 80.
 5. Морфофункциональное состояние тканевых базофилов у мышей различных инбредных линий / В соавторстве с Красноженовым Е.П., Агафоновым В.И. // Бюлл. экспериментальной биологии и медицины. Приложение 1, 2001. – С. 95-96.
 6. Реакция тканевых базофилов при трансплантационной терапии сахарного диабета / В соавторстве с Бочкаревой О.П., Ждановой О.С. // Материалы III конгресса молодых ученых и специалистов «Науки о человеке». - Томск, 16-17 мая 2002. – С. 195-196.
 7. Морфофункциональное состояние дермальных базофилов у больных с осложнениями сахарного диабета до и после имплантации островковых клеток / В соавторстве с Красноженовым Е.П. // Актуальные вопросы экспериментальной и клинической морфологии. - Томск, 2002, Вып. 2. – С. 228-229.
 8. Морфофункциональный статус тканевых базофилов при экспериментальном аллоксановом диабете на фоне имплантации островковых клеток поджелудочной железы свиньи / В соавторстве с Красноженовым Е.П. Загребиным Л.В. // Актуальные проблемы медицинской биологии. - Томск, 2002. – С. 53-54.
- Заявка № 2002112380/14 (012 908) на изобретение «Способ количественной оценки функциональной активности тучных клеток кожи» с приоритетом от 7.05. 2002.