

КЛІНІЧНА МЕДИЦИНА

УДК 616.379-008.64-08:615.36

БИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЭМБРИОНАЛЬНО-ТКАНЕВОЙ ТЕРАПИИ ИНСУЛИНА ВИСИМОГО САХА РН ОГО ДИА БЕТА

* *ГРИЩЕНКО В.И., БОБЫРЕВА Л.Е., БУГАЕВ В.Н.,
ШЕПИТЬКО В.И., ДВОРНИК И.Л., КАТЕРЕНЧУК В.И.,
БОБЫРЕВ В.Н.*

Сахарный диабет — одна из серьезнейших проблем мировой медицины. Самая ранняя из всех заболеваний инвалидизация, высокая смертность (третье место после сердечнососудистой патологии и злокачественных новообразований) определили сахарный диабет в качестве одного из первых приоритетов национальных систем здравоохранения всех без исключения стран мира [1, 5, 6]. Если в настоящее время сахарным диабетом страдают 180 млн. человек, то к 2010 г., по прогнозу ВОЗ, их число возрастет до 240 млн. Всемирная Организация Здравоохранения оценила современное состояние роста заболеваемости сахарным диабетом, как глобальную эпидемию, требующую решения не только медицинских, но и социальных проблем. Сегодня сахарный диабет поглощает 10% национального бюджета здравоохранения Украины [9]. Следовательно, поиск новых путей лечения этого заболевания и разработка способов профилактики его сосудистых и органных осложнений является актуальной проблемой современной диабетологии.

Целью исследования явилось изучение терапевтического эффекта криоконсервированной фетоплацентарной ткани в комплексной терапии больных инсулинзависимым сахарным диабетом.

Объект и методы исследования. Нами обследовано 11 практически здоровых лиц в возрасте до 40 лет и 81 больной инсулинзависимым сахарным диабетом (ИЗСД), из них женщин - 26, мужчин - 55; средний возраст больных составил 29,5 лет; длительность заболевания - 8,3 лет; период наблюдения - от 3 месяцев до 1 года. Контрольную группу составили 23 человека с ИЗСД, которым была назначена традиционная терапия (диета, инсулин, ангиопротекторные препараты, витамины), а 58 больным была произведена гетеротопическая трансплантация криоконсервированной плацентарной ткани совместно с эм-

бриональной поджелудочной железой по методике, разработанной в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины [7].

В отделе криоморфологии ИПКиК НАН Украины разработана методика криоконсервирования фрагментов плаценты, которую получают во время кесарева сечения, что позволяет избежать ее контаминации микроорганизмами при прохождении через естественные родовые пути. Отбор доноров производится в соответствии с существующими правилами проверки доноров на возможную инфицированность бактериальной флорой и вирусными инфекциями. После завершения цикла криоконсервации материал, предназначенный для трансплантации, подвергается проверке методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) на отсутствие краснухи, герпеса, сифилиса, ВИЧ-инфекции, гепатита В и С, микоплазмоза и токсоплазмоза.

Обследование больных включало: общеклинические и функциональные методы обследования (общий анализ крови, мочи; глюкоза крови ЭКГ, рентгеноскопия органов грудной клетки и др.), а также определение показателей липидного обмена - общий холестерин ("Биотест" Lachema), В- и В [8]; углеводного обмена - уровень глюкозы ортотолуидиновым методом, содержание гликозилированного гемоглобина [15]; состояние свободнорадикального перекисного окисления (СРПО) липидов - уровень ТБК-реактантов [11], диеновых конъюгатов [3] и активность антиоксидантного фермента - церулоплазмينا [10]. Обследование производилось до лечения, через 3 месяца и 1 год после трансплантации. Состояние периферической гемодинамики оценивалось по показателям доплерометрии, реовазографии и капилляроскопии. Работа

проведена на базе Полтавского регионального центра клеточной и тканевой трансплантации и лаборатории криоморфологии Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины. Полученные результаты обработаны статистически с использованием критерия Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение. Установлено, что у больных ИЗСД в контрольной группе, получавших традиционное лечение, потребность в инсулине снизилась на 6,23%, в то время как у больных, которым была произведена трансплантация эмбриональной ткани потребность в инсулине снизилась на 34,6%. Компенсация углеводного обмена происходила на фоне снижения показателей липидного обмена и уровня свободнорадикальных реакций (табл. 1).

Таким образом, трансплантация плаценты совместно с эмбриональной поджелудочной железой оказывает хороший терапевтический эффект, который сохраняется до 3-х месяцев и более. Следует отметить, что чем меньше длительность заболевания, тем эффект более выраженный. У некоторых больных (7 человек) через 3 месяца после трансплантации отмечалось повторное снижение потребности в инсулине, составившее в среднем 20,7%.

Прогресс в медицине обычно измеряется числом новых лекарств, технологий, операций, влияющих на количество леченых и вылеченных. Прогресс науки - это расширение научной информации, методов и научных направлений [12, 13]. Исследования эмбриональностволовых клеток (ЭСК) и открытие их уникальной способности воспроизводить эмбриогенез и органогенез изменило стратегию изучения жизни. Бластомеры предимплантационных зародышей млекопитающих представляют собой уникальное скопление делящихся

(им-мортализованных) эмбриональных клеток, окруженных блестящей оболочкой и находящихся в яйцеводах или матке. После имплантации в этих клетках формируется цитоскелет и они входят в длительный цикл онтогенетической дифференцировки с образованием зародышевых листков, тканей и органов. Если морулу или бластоцисту диссоциировать на отдельные клетки и поместить их на поверхность монослоя фибробластов, выращенных на пластике (так называемый фидерный слой), зародышевые клетки в питательной среде не могут прикрепиться к фидеру и не способны формировать цитоскелет. В таких условиях они продолжают делиться без цитодифференцировки, т.е. ведут себя как линия эмбриональных неограниченно делящихся клеток [12, 13]. Предполагается, что клетки фидерного слоя не дают ЭСК прикрепиться и вырабатывают специальные факторы, сдерживающие неограниченную пролиферацию этих клеток.

Если такие эмбриональные клетки перенести в культуру фибробластов, гепатоцитов или клетки костного мозга, они, продолжая делиться, постепенно превращаются в колонию дифференцированных клеток именно того фенотипа, куда были пересажены. Эмбриональные клетки, будучи перенесенными в разные клеточные культуры, могут превратиться в остеобласты, хондробласты, миообласты, гепатобласты и др. Уникальная способность эмбриональных клеток заключается в том, что в условиях *in vitro* они наделены потенцией дифференцироваться в ту ткань, клетки которой находятся в исследуемой культуре [2, 4, 12, 13].

Прекрасным материалом для трансплантации, подобным РСК, является плодная часть плаценты, которая ведаёт не только жизнеобеспечением плода, но и

регулирует его нормальное дозревание и развитие. В ней находятся в высокой концентрации биологически активные вещества - белки, выполняющие гормональную и ферментативную функции, а также полипептиды, относящиеся к ростовым факторам [2, 4, 12, 13]. В плаценте выявлены пептиды, гомологичные гонадотропинам и лактогенам, выполняющие роль соматотропно-го гормона (СТГ) во время внутриутробного развития плода. Также в ней синтезируются инсулиноподобные факторы 1 и 2, относящиеся к соматомединам и опосредующие действие СТГ. Из плаценты выделены и охарактеризованы факторы роста нервов и фибробластов, а также фактор, стимулирующий рост эндотелия сосудов; в ней выявляются все компоненты ренин-ангиотензиновой системы [1, 5, 9].

Сахарный диабет представляет собой заболевание, которое всегда обусловлено дефицитом инсулина, абсолютный при инсулинзависимом или относительный при инсулиннезависимом его клинических вариантах. Нарушение утилизации глюкозы и как следствие появление гипергликемии и глюкозурии является первым витком в сложнейшем патогенезе сахарного диабета. За ним или одновременно следуют нарушения водно-электролитного, жирового, белкового обменов, нарушения циркадианного ритма регуляторных и контринсулярных гормонов. Со временем на вершину этой пирамиды гормонально-метаболических изменений выносятся органые и системные изменения, так называемые поздние диабетические осложнения, затрагивающие практически все функциональные системы организма человека [1,5, 6].

Исходя из патогенеза сахарного диабета, его терапия базируется на трех основных принципах: 1) компенсации дефицита инсулина (диета, дозированные физические нагрузки, сахароснижающие

средства, введение инсулина); 2) коррекции гормонально-метаболических нарушений; 3) лечении и профилактики диабетических осложнений.

И хотя в арсенал средств лечения сахарного диабета 1 типа в последние годы вошли человеческие инсулины, "искусственная поджелудочная железа", индивидуальные глюкометры, организованы система обучения принципам самоконтроля в "школах сахарного диабета" и педологическая служба, сахарный диабет продолжает представлять собой серьезную медико-социальную проблему для большинства стран мира, т. к. сочетание неуклонного роста заболеваемости с отсутствием реальных профилактических мероприятий создает весьма пессимистический прогноз относительно будущего состояния здоровья населения планеты [1,5, 9].

Инсулин - это полипептид, его молекула состоит из двух аминокислотных цепей - А и В, соединенных двумя дисульфидными мостиками, а дополнительный дисульфидный мостик соединяет два остатка цистеина (положения 6 и 11) в цепи А. Инсулин обладает не только видовой, но и индивидуальной принадлежностью [14]. Пептидные гормоны являются гидрофильными соединениями и, как правило, взаимодействуют с расположенными на поверхности клетки мембранными рецепторами. Гормон-рецепторное взаимодействие инициирует высокодифференцированную биологическую реакцию, в которой участвуют многие клеточные компоненты. Рецептор обладает следующими свойствами: 1) четкой структурной специфичностью; 2) насыщенностью (т.е. число связывающих сайтов конечно); 3) тканевой специфичностью, совпадающей с реактивностью клеток-мишеней; 4) сродством, которое укладывается в пределы физиологических концентраций гормона; 5)

обратимостью действия [9, 14]. Трехмерная структура инсулина определяет его специфическое связывание с рецептором и биологическую активность. Важно отметить, что молекулы всех инсулинов обладают общим высоко консервативным участком, включающим область связывания рецептора. Анализ инсулинов у разных видов животных установил, что наиболее консервативные аминокислоты - это A1, A19, A20, A21, а также B23, B24 и B25 [9, 14]. При этом все эти консервативные остатки группируются и взаимодействуют с рецептором инсулина, что позволяет понять, почему клетки животных разных видов реагируют на инсулины даже филогенетически отдаленных организмов, но учитывая то, что вводимый инсулин - это белок, к нему вырабатываются антитела, которые и препятствуют взаимодействию гормона со своими специфическими рецепторами [8, 13]. Эти данные позволяют понять, почему на сегодняшний день мы научились лечить только острые осложнения сахарного диабета, а не само заболевание.

Паренхиму эндокринного органа можно не только трансплантировать (имплантировать), его можно вырастить (клонировать) в организме пациента [12, 13]. Мы считаем это наиболее целесообразным в решении проблемы сахарного диабета.

Процесс внутриутробного развития зародыша человека продолжается в среднем 280

суток или 10 лунных месяцев. Эмбриональное развитие человека принято делить на три периода: начальный (1-я неделя), зародышевый (2-8-я недели) и плодный (с 9 недели развития до рождения ребенка). Дифференцировка зародышевых листков и мезенхимы начинается в конце 2-й - в начале 3-й недели. В процессе гистогенетической дифференцировки происходит специализация тканевых зачатков и формирование различных эмбриональных тканей. При дифференцировке клеток из исходной стволовой клетки образуются диффероны - последовательные ряды клеток (стволовые диффероны). Количество дифферонов в каждом виде тканей может быть различным. Результатом гистогенетических процессов является формирование четырех типов тканей - эпителиальных, внутренней среды, мышечной и нервной. Их формирование начинается в эмбриональном периоде и заканчивается после рождения. Источником постэмбрионального развития ткани служат региональные стволовые клетки (РСК), обладающие высоким потенциалом развития [2, 4].

Плацента формируется с конца 2-й недели и завершает его к началу 13-й недели, т.е. она начинает функционировать на этапе образования зародышевых листков, формирования вне- зародышевых органов и превращения многоклеточного зародыша в плод.

Биохимические показатели углеводного, липидного обменов и антиоксидантно-прооксидантного баланса в сыворотке крови у практически здоровых и больных ИЗСД на фоне традиционной терапии и трансплантации криоконсервированной плацентарной ткани совместно с эмбриональной поджелудочной железой

Показатели	Здоровые люди (n=11)	Традиционная терапия (n=23)		Трансплантация (n=58)	
		до лечения	через 3 месяца	до лечения	через 3 месяца
Глюкоза, ммоль/л	4,3±0,14	12,48±0,26 p<0,001	7,0±0,22 p ₁ <0,001	11,8±0,36 p<0,001	6,95±0,11 p ₁ <0,001
Гликогемоглобин, HbA1c, %	3,82±0,11	9,83±0,19 p<0,001	9,74±0,38 p ₁ >0,05	9,86±0,22 p<0,001	6,72±0,29 p ₁ <0,001
Общий холестерин, ммоль/л	4,29±0,07	4,88±0,06 p<0,001	4,96±0,11 p ₁ >0,05	4,85±0,04 p<0,001	4,6±0,01 p ₁ <0,01
β- и пре-β-липопротеиды, г/л	4,28±0,07	5,24±0,09 p<0,001	4,71±0,21 p ₁ <0,05	5,20±0,09 p ₁ <0,05	4,58±0,33 p ₁ <0,05
ТБК-реактанты, мкмоль/л	3,49±0,13	6,66±0,26 p<0,001	6,40±0,36 p ₁ >0,05	6,77±0,34 p<0,001	3,49±0,32 p ₁ <0,001
Диеновые конъюгаты, мкмоль/л	20,95±0,39	47,83±0,68 p<0,001	39,76±2,76 p ₁ <0,01	47,88±0,85 p<0,001	39,86±1,35 p ₁ <0,001
Церулоплазмин, ед/мл	127,5±2,2	274,5±5,7 p<0,001	203,1±18,0 p ₁ <0,001	274,2±6,5 p<0,001	233,5±7,9 p ₁ <0,001

Примечание: p – различия достоверны по сравнению со здоровыми лицами; p₁ – различия достоверны по сравнению с данными до лечения.

I. Комpartment стволовых клеток (плюрипотентные, полипотентные)

II. Комpartment коммитированных родоначальных клеток (мультипотентные)

III. Комpartment коммитированных родоначальных прогениторных клеток (олигопотентные, унипотентные)

IV. Комpartment клеток-предшественников (прекурсорные бласты)

V. Комpartment созревающих клеток

VI. Комpartment зрелых клеток

Эмбриональные зачатки

Тканевые производные

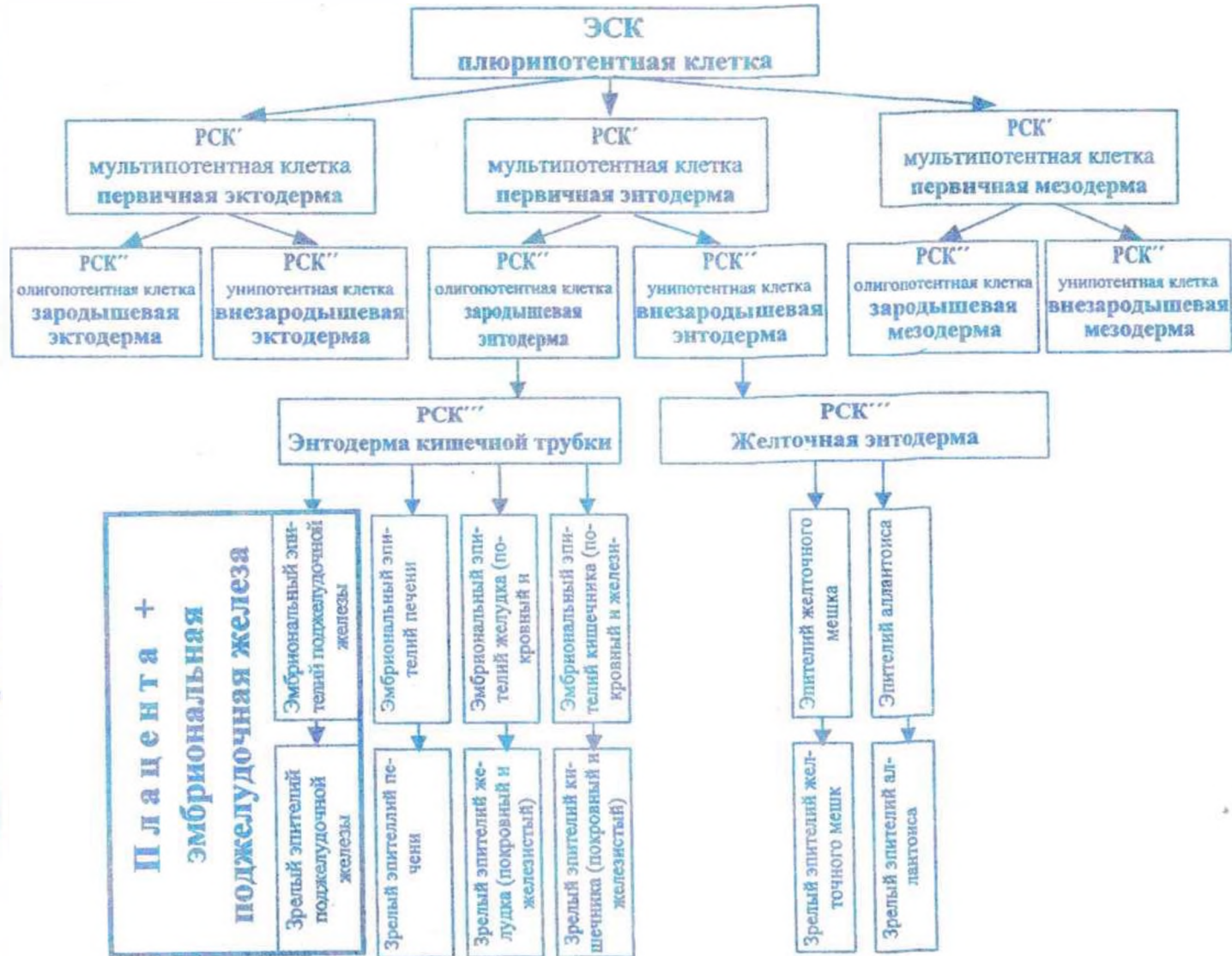


Рис. 1. Гипотетическая схема индукции трансплантатом репарации инсулярного аппарата реципиента при эмбрионально-тканевой терапии сахарного диабета.

Клетки, чтобы выполнить свои специфические функции (генетически детерминированные), должны быть специализированными и зрелыми. После трансплантации эмбриональных клеток по мере их созревания на мембране малодифференцированной клетки формируются рецепторы гистосовместимости, и, как следствие, происходит ее уничтожение иммунной системой реципиента. Поэтому говорить о заместительном характере эмбриональных клеток или тканей вряд ли возможно.

Можно предположить, что при трансплантации плаценты, в силу сложных межклеточных взаимоотношений целый ряд РСК реципиента переходит из состояния “покоя” в “активное” и начинается их

усиленная пролиферация. Для четко направленного действия плаценты ей необходим “маячок” - соответствующий пул эмбриональных клеток, в данном случае - эмбриональная поджелудочная железа (рис. 1). РСК III-го и IV-го порядков в “маячке” не нуждаются.

Такие, на наш взгляд, гипотетические механизмы эмбрионально-тканевой терапии, которые позволяют в значительной степени снизить потребность в инсулине, добиться длительной стойкой компенсации заболевания и, что очень важно, профилактики прогрессирования поздних осложнений, главным образом сосудистых, у больных, страдающих сахарным диабетом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балаболкин М.И. Сахарный диабет- Москва: Медицина, 1994,- 384 с.

2. Вилли К., Детье В. Биология (Биологические процессы и законы).- Москва: Мир, 1974,- 822 с.

3. Воскресенский О.Н., Туманов В.А. Ангиопротекторы.- Киев: Здоров'я, 1982.— 120с.

4. Гистология, цитология и эмбриология / Под ред. проф. Ю. И. Афанасьева, проф.Н.А.Юриной,- М.: Медицина, 1999,-744с.

5. Дедов И.И. Генетические, иммунологические и метаболические аспекты патогенеза сахарного диабета // Первый Российский конгресс по патофизиологии. Патофизиология органов и систем. Типовые патологические процессы (экспериментальные и клинические аспекты). Тезисы докладов. Москва, 17-19 октября 1996 г. М., 1996,-С.174.

6. Ефимов А.С. Некоторые итоги и перспективы развития диабетологии // Пробл. эндокринологии,- 1988.- Т.34, №3.- С. 8-14.

7. Заготівля, кріоконсервування плацентарної тканини і її клінічне застосування. Методичні рекомендації / Грищенко В.І., Прокопюк О.С., Кузьміна Ю та інш.- Харків, 1996.- 24 с.

8. Климов А.Н., Ловягина Т.Н., Баньковская Э.Г. Турбометрический метод определения липопропротеидов и хиломикронов в сыворотке крови и тканях // Лаб. дело.- 1966~№5.~ С.276-279.

9. Корпачев В.В. Инсулин и

инсулино- терапия.- Киев: РИА «Триумф», 2001456 с.

10. Метод количественного определения церулоплазмينا / Сиверина О.Б., Басевич В.В., Басова Р.В. и др.// Лаб. дело,- 1986.- №10.- С.618-621.

11. Мирончик В.В. Особенности свободнорадикального липопереокисления плазмы крови при ишемической болезни и гипертонической болезни // Дисс.... канд. мед наук,- Минск, 1984.- 247 с.

12. Репин В.С. Медицинская клеточная биология: новые фундаментальные и прикладные исследования .- Трансплантация фетальных тканей и клеток человека / Сб. статей под ред. д.м.н., проф. Г.Т.Сухих, д.биол.н. А.Н.Ерина,- М., 1996,- С. 19-27.

13. Репин В.С. Трансплантация клеток: новые реальности в медицине.- Сб. научных трудов. Трансплантация фетальных тканей и клеток // Бюлл. эксперим. биол. и медицины. Приложение 1,- 1998.-С. 14-28.

14. Тепперман Ж., Тепперман Х. Физиология обмена веществ и эндокринной системы Москва: Мир, 1989,- 653 с.

15. Determination of the glycosylated hémoglobine (HbA_{1c}) with a new microcolumne procedure. Suitability of the technique for the assessing the clinical management of diabetes mellitus / Abraham E.C., Huff T. A., Cope N.D. et al. // Diabetes.- 1978,- V.27, №9,- P.931-937.

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Украинская медицинская стоматологическая академия, г. Полтава

УДК 616.379-008.64-08:615.36

БІОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ЕМБРІОНАЛЬНО-ТКАНИННОЇ ТЕРАПІЇ ІНСУЛІНЗАЛЕЖНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ

ГРИЩЕНКО В.І., БОБИРЬОВА Л.С., БУГАСЬ В.М., ШЕПІТЬКО

Статья
поступила
28.10.2001 г.

В. І., ДВОРНИК І.Л., КАТЕРЕНЧУК В.І., БОБИРЬОВ В.М.

На підставі клінічного обстеження (81 хворий на інсулінзалежний цукровий діабет) вивченні терапевтичний ефект криоконсервованої фетоплацентарної тканини (контрольна група - 23 хворих на ІЗЦД, 58 хворим була зроблена гетеротопічна трансплантація фетоплацентарної тканини).

Встановлено, що у хворих на ІЗЦД в контрольній групі, які отримували традиційне лікування, потреба в інсуліні зменшилася на 6,23%, у той час як у хворих, яким була зроблена трансплантація фетоплацентарної тканини, потреба в інсуліні зменшилася на 34,6%. Компенсація вуглеводного обміну відбувалася на фоні

зниження показників ліпідного обміну і рівня вільнорадикальних реакцій. Таким чином, плацента дає добрий терапевтичний ефект, який зберігається від 3-х місяців і більше.

З урахуванням механізмів ембріогенезу не розроблена гіпотетична схема індукції трансплантатом репарації інсулярного апарату рециєнта під час ембріонально-клітинної терапії цукрового діабету.

Ключові слова: плацента, ембріональна підшлункова залоза, ембріонально-клітинна терапія, трансплантація, цукровий діабет.

UDC 616.379-008.64-08:615.36

BIOLOGICAL ASPECTS OF EMBRYONIC-TISSUE THERAPY OF INSULIN-DEPENDENT DIABETUS MELLITUS

GRISCHENKO V., BOBYREVA L., BUGAYEV V., SHEPIT'KO V., DVORNIK I., KATERENCHUK V., BOBYREV V.

On the base of clinical examine (81 patients with insulin-dependent diabetes mellitus - IDDM) it was investigated therapeutic effect of a placenta! tissue and embryonic pancreas (control group - 23 patients who was treated with traditional therapy, 58 patients there was made heterotopical transplantation of a placental tissue and embryonic pancreas).

Is determined, that for the patients with IDDM in control group, who received traditional treatment, the need of an insulin has decreased on 6,23 %, while patient's need of an insulin was decreased on 34,6% after the transplantation of a placental tissue and embryonic pancreas. The compensation of carbohydrate metabolism was on a background of decrease of parameters of lipidmetabolism and level of free-radical of reactions.

Thus, the placenta with embryonic pancreas is having good therapeutic effect,

which is saved from the 3-rd months and more. With the account of mechanisms of embryonic hystogenesis the hypothetical scheme of the induction by a transplant of reparation of beta-cells of the recipient is developed at embryonic-tissue therapy of IDDM.

Key words: the placenta, embryonic pancreas, embryonic-tissue therapy, transplantation, diabetes mellitus.